

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
 (PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
 9th Floor
 Taka-ai Building
 15-2, Nihonbashi 3-chome
 Chuo-ku
 Tokyo 103-0027
 JAPON

JA 903969

Date of mailing (day/month/year) 20 February 2002 (20.02.02)	
Applicant's or agent's file reference JA903969	
International application No. PCT/JP00/04425	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AU,IN,KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rul 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Elliott PERETTI</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--



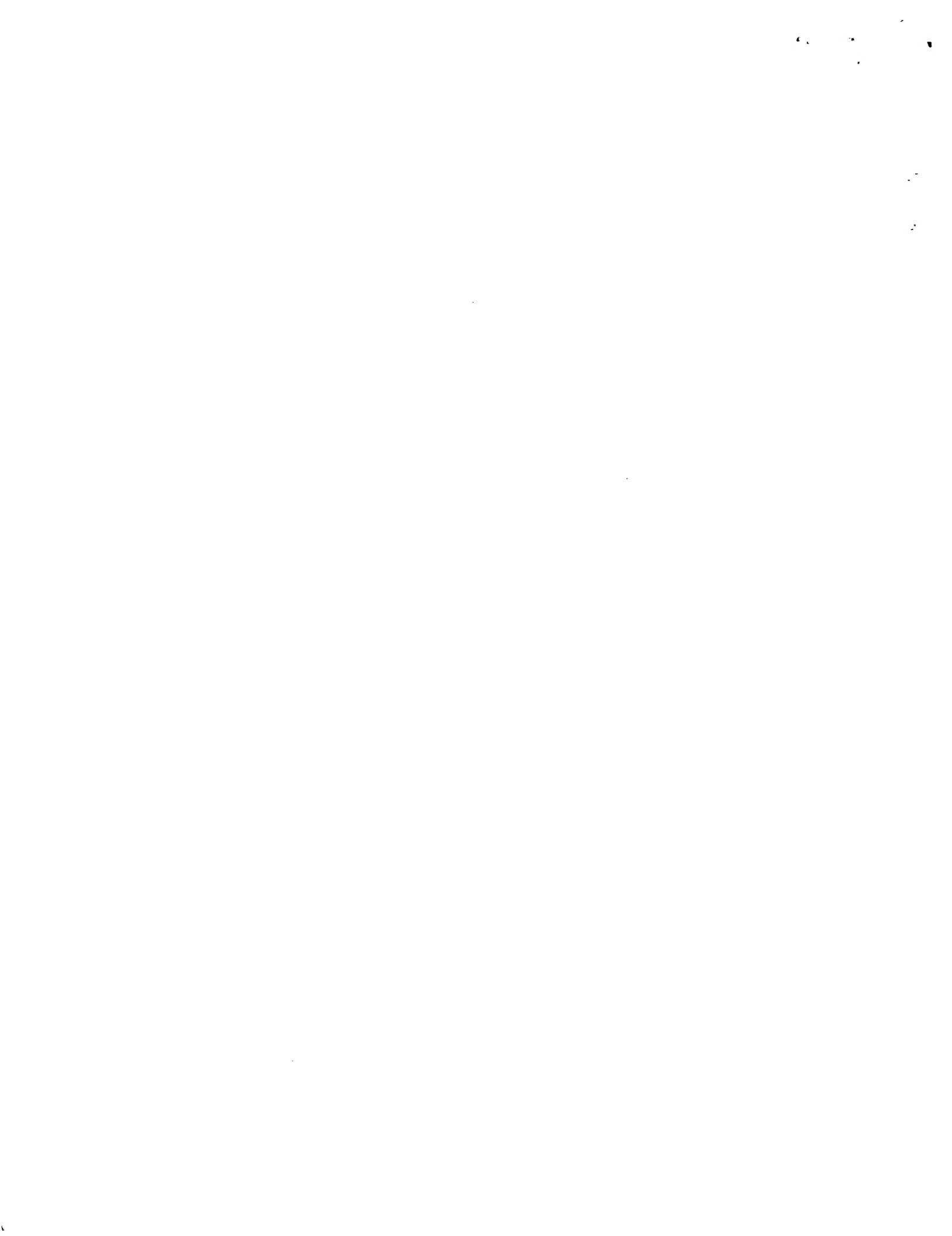
47
Translation

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA903969	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/04425	International filing date (day/month/year) 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01H 5/00, C12N 5/14, 15/52		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 December 2000 (01.12.00)	Date of completion of this report 06 August 2001 (06.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04425

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-24 _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ 2,3,6,8-11 _____, as originally filed
 pages _____ _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____ 1,5,7 _____, filed with the letter of 14 May 2001 (14.05.2001)

the drawings:

pages _____ 1-24 _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____ _____, as originally filed
 pages _____ _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

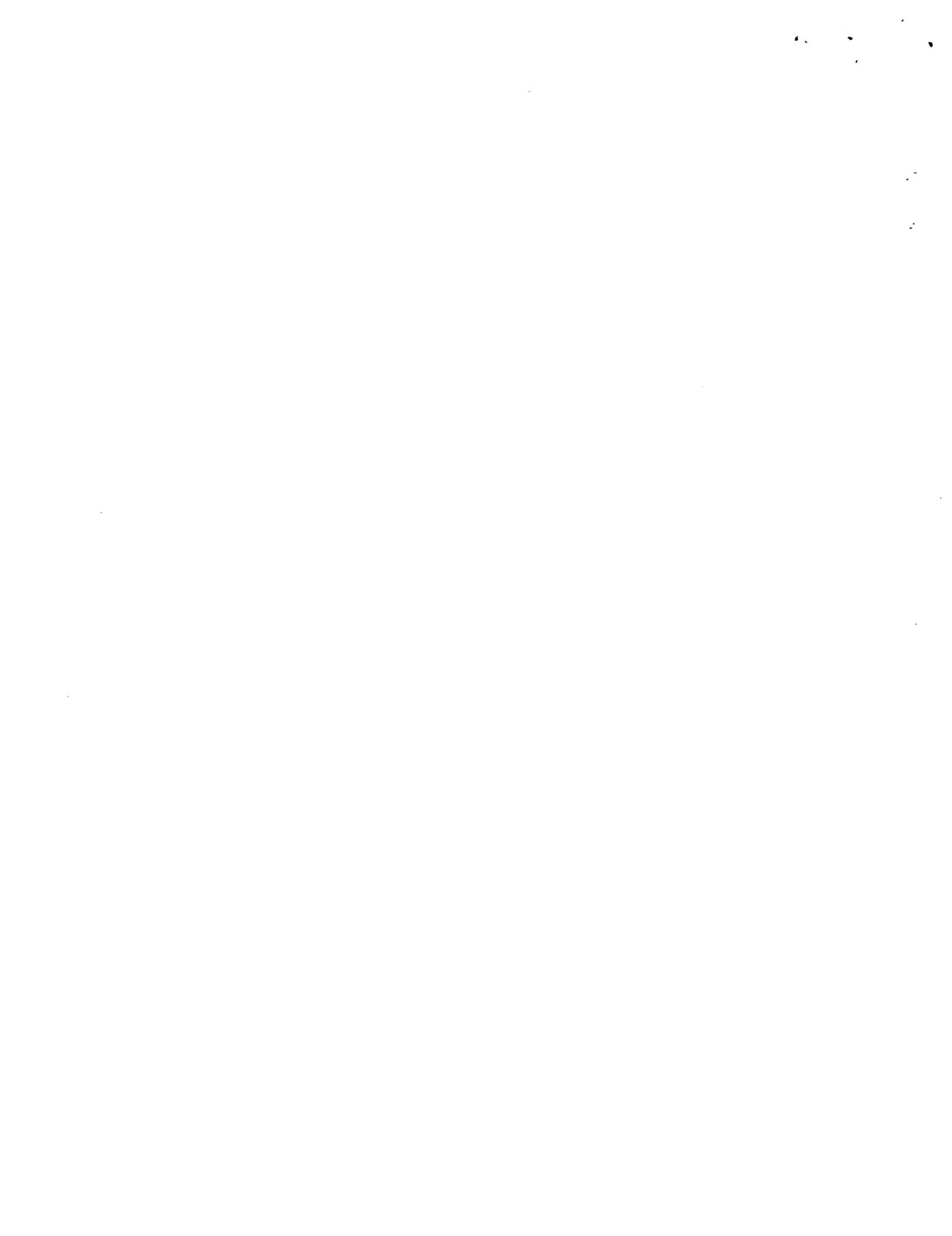
4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____ 4 _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/04425

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

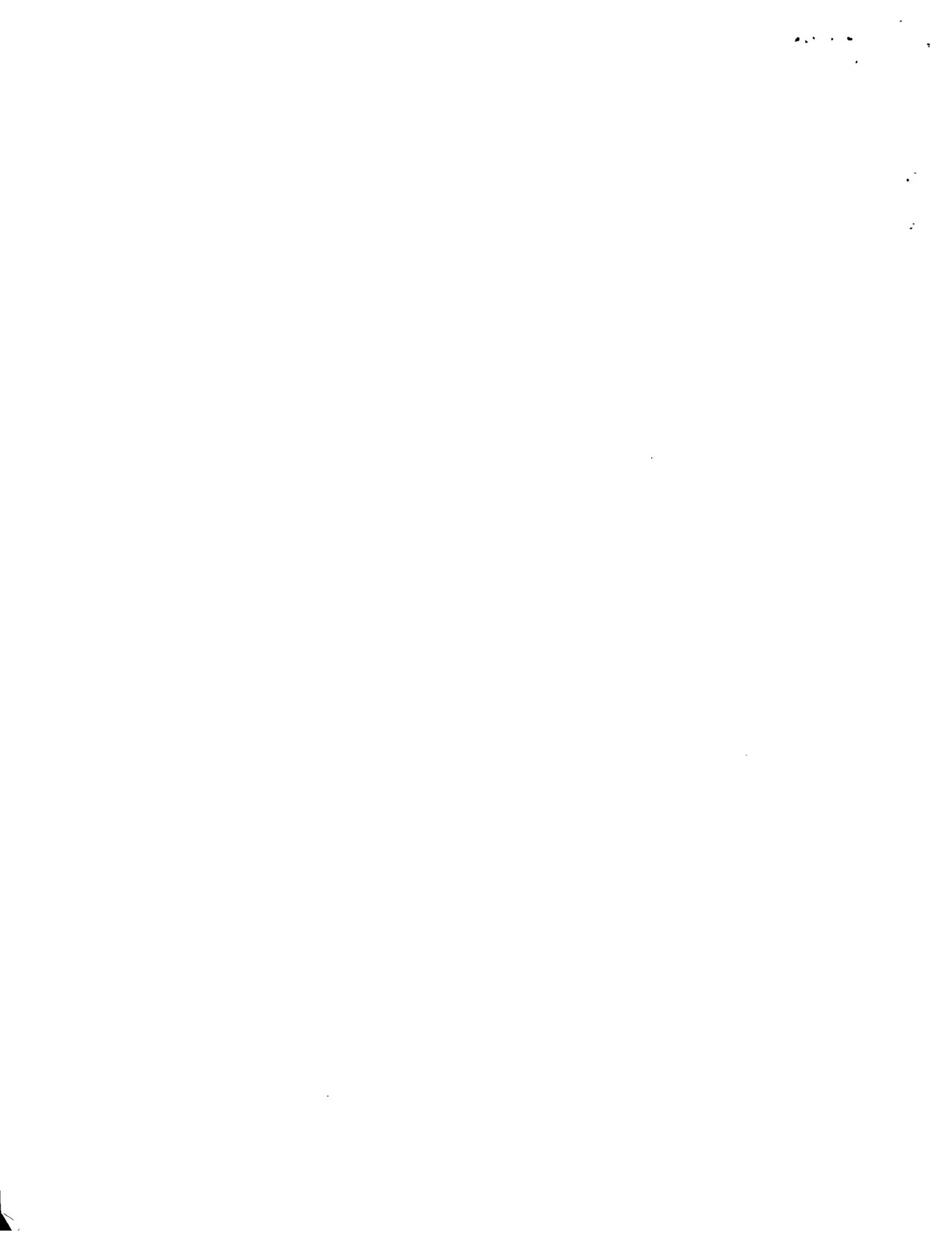
1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3,5-11	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-3,5-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3,5-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-11

Document 1 [Soil Sci. Plant Nutr., Vol. 43, (Special Edition), 1997, pp. 975-980] cited in the international search report describes the cloning of the cDNA of the *naat* gene that codes for nicotianamine aminotransferase (NAAT), an enzyme in the biosynthetic pathway of mugineic acids, which are induced by iron deficiency, in barley, and this examination does not recognize any particular difficulty in isolating the corresponding genomic gene based on this cDNA. Document 1 (see especially Introduction) suggests the creation of plants tolerant to iron deficiency by introducing genes from the mugineic acid regulatory pathway into plants, and this examination finds that persons skilled in the art can easily conceive of preparing a plant tolerant to iron deficiency by introducing the above gene together with a suitable promoter into rice.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/01762 A1(51) 国際特許分類⁷: A01H 5/00, C12N 5/14, 15/52

CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04425

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2000年7月4日 (04.07.2000)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 敏
(MORI, Satoshi) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区
本郷5-32-2-206 Tokyo (JP). 中西啓仁 (NAKANISHI,
Hiromi) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木
5-32-20-308 Tokyo (JP). 高橋美智子 (TAKAHASHI,
Michiko) [JP/JP]; 〒112-0006 東京都文京区小日向
3-18-4 Tokyo (JP). 西澤直子 (NISHIZAWA, Naoko)
[JP/JP]; 〒113-0001 東京都文京区白山1-37-9-705
Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

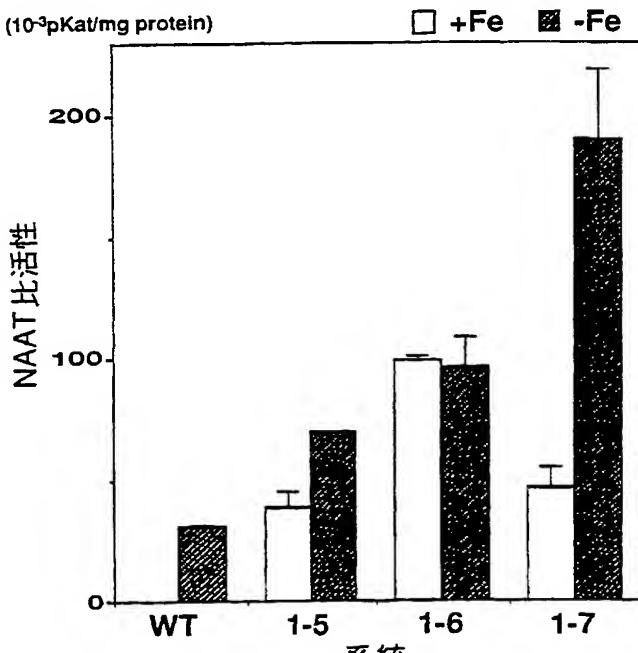
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/190318 1999年7月5日 (05.07.1999) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY)

/統葉有/

(54) Title: CONSTRUCTION OF RICE TOLERANT TO IRON DEFICIENCY

(54) 発明の名称: 鉄欠乏耐性イネの創製



a...SPECIFIC NAAT ACTIVITY
b...STRAIN

(57) Abstract: A gramineous plant having tolerance to iron deficiency which can grow even in an area with iron deficiency. More particularly, a gramineous plant having tolerance to iron deficiency and capable of vigorously growing even in calcareous alkaline soil which is constructed by transferring a gene of an enzyme in the pathway of the biosynthesis of mugineic acids in gramineous plants into a gramineous plant. A method of constructing a gramineous plant having improved iron absorbability which comprises transferring a gene encoding an enzyme (preferably nicotianamine aminotransferase; NAAT) in the pathway of the biosynthesis of mugineic acids into a gramineous plant; a gramineous plant constructed by the above method; a method of cultivating the above gramineous plant having improved iron absorbability; and a crop obtained by the cultivation. Namely, the construction of a novel gramineous plant having tolerance to iron deficiency.

WO 01/01762 A1

/統葉有/



(74) 代理人: 佐伯憲生(SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).

添付公開 類:
— 國際調査報告

(81) 指定国(国内): AU, CN, IN, KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、鉄欠乏地帯での生育が可能な鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供する。より詳細には、本発明は、イネ科植物のムギネ酸類の生合成経路上の酵素の遺伝子をイネ科植物に導入することにより、石灰質アルカリ土壌などでも旺盛に生育する鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供する。

本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素、好ましくはニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法に関する。また、本発明は前記した方法により製造され得るイネ科植物、前記鉄吸収性が改善されたイネ科植物を育成する方法及び当該育成により得られる作物に関する。即ち、本発明は鉄欠乏耐性を有する新規なイネ科植物の創製に関するものである。

明 細 書

鉄欠乏耐性イネの創製

技術分野

本発明は、鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を製造する方法、その方法により得られたイネ科植物並びに当該イネ科植物を育成する方法及びその方法で得られた作物に関する。

より詳細には、本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、好ましくは当該酵素がニコチアナミン・アミノ基転移酵素である遺伝子を導入して鉄欠乏耐性を有するイネ科植物の創製に関する。

背景技術

地球上の90%近くの土壤は、何らかの問題を抱える不良土壤であると言われている。不良土壤では一般的に、植物の生育に必須な元素を質的または量的に欠いているために植物の生育が阻害されたり、あるいは重金属等を多く含む土壤による生育障害などが起こる。不良土壤の代表として、乾燥地塩類集積土壤がある。これは、人為的な過剰灌漑や、長年にわたる乾燥気候により、土壤上層にNaClやNa₂CO₃が集積したものと、CaCO₃やCaSO₄が集積したものとがある。ナトリウムの集積した土壤では、塩類濃度障害を引き起こし、石灰質の土壤では、鉄欠乏障害を引き起こす。

地球上の耕地土壤の約30%は、潜在的な鉄欠乏地帯と言われている(Wallence et al. 1960)。半乾燥地域の石灰質土壤では、毛管現象により母材から溶出した石灰質成分が地表に集積する。このような土壤では、pHが上昇しアルカリ性を示すため土壤中の鉄がFe(OH)₃の形で存在し、溶解度が極めて低くなる。

このような土壤に生育した植物は、可溶性の鉄が少ないとにより、鉄欠乏クロロシスとなり、生育が阻害されるか、または枯死する。

高等植物の鉄獲得機構は、ストラテジーI (Strategy-I) とストラテジーII (Strategy-II) という2つに区分される。ストラテジーIは、イネ科を除く高等

植物の鉄獲得機構である。土壤中の三価の不溶態鉄を根の細胞表面に存在する三価鉄還元酵素により還元し、二価鉄のトランスポーターで吸収する機構である。この機構を有する植物の中には、根圏にプロトンを放出し、根圏のpHを下げることで三価鉄還元酵素の活性を増加させる機構を有しているものや、フェノール系化合物を根圏に放出し、形成されたFe (III) - フェノール系化合物キレートが細胞膜表面に存在する三価鉄還元酵素にFe (III) を供給する機構を持っているものが存在する。最近の研究で、シロイヌナズナの根に特異的に発現する二価鉄のトランスポーターIRT1 (Eide et al. 1996) や、シロイヌナズナの三価鉄還元酵素の遺伝子が単離された (Robinson et al. 1997)。

ストラテジーIIは、単子葉植物の中のイネ科植物にのみ見られる鉄獲得機構である。イネ科植物は鉄欠乏条件下で、三価鉄キレート活性を有するムギネ酸類を根圏に放出し、「Fe (III) - ムギネ酸」錯体として根から鉄を吸収する (Takagi et al. 1984)。ムギネ酸類 (MAs) は、ムギネ酸 (MA) 、2' - デオキシムギネ酸 (DMA) 、3 - ヒドロキシムギネ酸 (HMA) 、3 - エピヒドロキシムギネ酸 (epiHMA) 、アベニン酸 (AVA) 、ディスティコン酸、エピヒドロキシデオキシムギネ酸 (epiHDMA) の7つが知られており、ムギネ酸類 (MAs) は全て第1図に示すようにメチオニンを前駆体として合成される (Shojima et al. 1990, Ma et al. 1998)。

ムギネ酸の分泌には概日リズムが存在し (Takagi et al. 1984)、日の出後にその分泌量が最大となり、夜には分泌されなくなる。また、鉄欠乏のオオムギ根で分泌前に膨らんでいた顆粒が、分泌後にしばむ現象が観察され (Nishizawa et al. 1987)、この顆粒内でムギネ酸が合成されていると考えられている。これらのことから、イネ科植物の鉄欠乏応答は、ムギネ酸合成のみならず、鉄欠乏シグナルの伝達、根の形態変化など複雑な制御系により成立していることが示唆される。

ムギネ酸合成経路に関わる酵素として、ニコチアナミン合成酵素の遺伝子が単離され、鉄欠乏により誘導されていることが報告された (Higuchi et al. 1999)。また、ニコチアナミンアミノ基転移酵素 (NAAAT) の遺伝子が単離され、鉄欠乏により誘導されていた (Takahashi et al. 1997)。

また、鉄欠乏オオムギ根、コントロールのオオムギ根から抽出したmRNAを

用いたディファレンシャルスクリーニングにより、鉄欠乏条件下で特異的に誘導される遺伝子 *I ds 1*、*I ds 2*、*I ds 3* が単離された。*I ds 1* は、メタロチオネイン様タンパク質をコードする遺伝子である(Okumura et al. 1991)。*I ds 2* は、その遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列が、水酸化酵素に相同性をもつ遺伝子であり(Okumura et al. 1994)、*I ds 3* もまた、その遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列が、水酸化酵素に相同性をもつ遺伝子であった(Nakanishi et al. 1993)。エピヒドロキシムギネ酸合成経路には、水酸化反応が 2 力所存在し、この遺伝子がこの反応を触媒する酵素をコードしているものと考えられている。

また、オオムギ根において鉄欠乏により誘導されるタンパク質として、IDS 3 タンパク質、アデニンリボースリン酸転移酵素(板井, 1999)、ギ酸脱水素酵素(Suzuki et al. 1998)、そして 36 kDa タンパク質(入船, 1991)などが挙げられる。イネ科植物は、鉄欠乏条件で、ムギネ酸を生合成するが、このとき根に含まれるメチオニンが減少するためにメチオニンサイクルでメチオニンを合成すると共に、生じたアデニンをAMPに変換するためにアデニンリボースリン酸転移酵素が誘導されていると考えられている(板井, 1999)。

ギ酸脱水素酵素は、メチオニンサイクルで生じたギ酸を分解する。また鉄欠乏のイネの根では、ミトコンドリアの形態変化と電子伝達系のエネルギーチャージの減少(Mori et al. 1991)が報告されており、ギ酸脱水素酵素は、鉄欠乏により生じた嫌気条件により誘導され、エネルギー源としてのNADHの供給をしているものと考えられている。

一方、人口の増加に伴って食糧の増産が今後の人類の生存の条件として大きな問題となってきている。イネは人類の古来からの重要な食糧のひとつであるが、鉄欠乏地帯でのイネの生育は難しいのが現状である。鉄欠乏地帯でイネの生育が可能となれば食糧の増産も可能となり、食糧増産の問題の解決策のひとつとして注目されている。

発明の開示

本発明は、鉄欠乏地帯での生育が可能な鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供

することを目的としている。

より詳細には、本発明は、イネ科植物のムギネ酸類の生合成経路上の酵素の遺伝子をイネ科植物に導入することにより、石灰質アルカリ土壌などでも旺盛に生育する鉄欠乏耐性を有するイネ科植物を提供することを目的としている。

本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法、より詳細には、当該酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）であり、それをコードする遺伝子 *n a a t* を導入する鉄吸収性が改善されたイネ科植物を製造する方法に関する。

また、本発明は前記した方法により製造され得るイネ科植物に関する。より詳細には本発明は、イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入してなる鉄吸収性が改善されたイネ科植物、さらに詳細には、当該酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素（N A A T）であり、それをコードする遺伝子 *n a a t* が導入されてなる鉄吸収性が改善されたイネ科植物に関する。

さらに、本発明は、前記鉄吸収性が改善されたイネ科植物を育成する方法及び当該育成により得られる作物に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、鉄欠乏オオムギ根のムギネ酸類生合成経路と根圏環境を図示したものである。

第2図は、*n a a t - A* のcDNAを挿入したイネ科形質転換用のバイナリーベクター p I G 1 2 1 Hm の遺伝子の配列を示したものである。

第3図は、導入された遺伝子の検出をサザンハイブリダイゼーション法により行った結果を示す図面に代わる写真である。第3図のWTは野生種のイネの場合を示し、コントロールはベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1及び15-2は35Sプロモーターを有する形質転換体を示す。

第4図は、鉄存在 (+ F e) 及び鉄欠乏 (- F e) の水耕液で栽培した根にお

けるN A A Tの活性を測定した結果を示すものである。第4図の白抜き部分は+ F eの場合を示し、斜線部分は- F eの場合を示す。WTは野生種のものを示し、1-5、1-6及び1-7は形質転換体のものを示す。

第5図は、アルカリ土壌に移植後8週目の各イネの生育状況を示す図面に代わる写真である。第5図のコントロール (control) は、ベクターのみを移植した対照のイネを示し、その右側のイネは形質転換したものである。

第6図は、アルカリ土壌移植後の各イネの草丈の変化をグラフにして示したものである。黒丸印は形質転換体15-2を示し、黒四角印は形質転換体8-1を示し、白丸印はコントロールとして用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

第7図は、単離されたゲノム *n a a t* を含むファージDNAのひとつの制限酵素地図を示すものである。第7図中のEはEcoRIを、HはHindIIIを、BはBamHIを、NはNotIをそれぞれ示す。両端のNotIサイトはIXIIのアームにあるNotIである。

第8図は、N A A Tゲノム断片を挿入したイネ科形質転換用のバイナリーベクターpB1GRZ1の遺伝子の配列を示したものである。第8図のNPTIIはカナマイシン耐性遺伝子を、HPTはハイグロマイシン耐性遺伝子を、GUSはイントロン入りβグルクロニダーゼ遺伝子を、LacZはβガラクトシダーゼ遺伝子を、35Pは35Sプロモーターを、NPはNOSプロモーターを、NTはNOSターミネーターを、MCSはマルチクローニングサイトを、RioriはRiプラスミド複製起点をそれぞれ示している。

第9図は、得られたゲノム *n a a t* の塩基配列を示した図である。

第10図は、得られたゲノム *n a a t* の塩基配列とcDNAと比較して決定した *n a a t - A* と *n a a t - B* の5'上流、エキソン、イントロン、3'下流を示した図である。第10図において大文字がcDNAに転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。

第11図は、得られたゲノム断片の模式図を示す。第11図中のEはEcoRIを、HはHindIIIを、BはBamHIを示す。

第12図は、*n a a t - A* 及び *n a a t - B* のcDNAにおけるイントロンの

挿入位置とイントロンのサイズを示したものである。

第13図は、cDNAから予想されるNAAAT-Aのアミノ酸配列をアミノ酸の1文字表記で示したものである。

第14図は、cDNAから予想されるNAAAT-Bのアミノ酸配列をアミノ酸の1文字表記で示したものである。

第15図は、ゲノム*n a a t*を導入したイネのアルカリ土壌に移植後10週間目の生育の状況を示した図面に代わる写真である。第15図のコントロールは、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム*n a a t*で形質転換したものである。

第16図は、ゲノム*n a a t*を導入したイネのアルカリ土壌移植後の草丈の変化をグラフにして示したものである。第16図の左側はゲノム*n a a t*で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

発明を実施するための最良の形態

単子葉植物の中のイネ科植物にのみ見られる鉄獲得機構である前記したストラテジーI Iは、ムギネ酸類を生合成し、これを放出することにより鉄を獲得する方法であることから、ムギネ酸類の生合成経路（第1図参照）における酵素の強化方法について検討した。

本発明者らは、ムギネ酸合成経路上の酵素としてニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAAAT）にまず着目し、その遺伝子*n a a t*を導入してみたところ、驚くべきことに、遺伝子が導入されたイネは石灰質アルカリ土壌でも旺盛に生育することを見出した。

ニコチアナミンアミノ基転移酵素（NAAAT）の遺伝子*n a a t - A*のcDNAを、pIG121HmにXbaI及びSacI部位を使って組み込んで、第2図に示すバイナリーベクターを作成した。得られたベクターをアグロバクテリウムに導入し形質転換に用いた。

イネの形質転換はヒエイラ（Hieiら（1994））の方法に従い、材料に「ツキノヒカリ」を用い、胚盤から誘導したカルスを前記した形質転換したアグロバクテリウム懸濁液に浸し感染させて、再生体（T1植物）を得、この種子から最終的

に 34 系統の形質転換イネを得た。

導入された遺伝子の検出をサザンハイブリダイゼーション法により行った。結果を第3図に示す。第3図のWTは野生種のイネの場合を示し、controlはベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1及び15-2は35Sプロモーターを有する形質転換体を示す。第3図に示されるように形質転換体はいずれも $naat-A$ を過剰発現していることがわかる。また、35S形質転換イネのうち、8-1、15-2には少なくともそれぞれ5コピー、2コピーの $naat$ が導入されたことが分かった。

遺伝子 $naat$ を導入することにより、野生種やベクターのみを導入したものに比べてニコチアナミンアミノ基転移酵素(NAAT)が過剰に発現され、その結果としてムギネ酸合成経路が活性化され、鉄の取り込みに必要とされるムギネ酸類が多量に産生されていることが推察される。

そこで、まずこれらの種のNAAT活性を検討した。発芽後3週間の幼植物(T2)を鉄存在(+Fe)及び鉄欠乏(-Fe)の水耕液でそれぞれ2週間栽培し、それぞれの根におけるNAATの活性を測定した結果を第4図に示す。第4図の白抜き部分は+Feの場合を示し、斜線部分は-Feの場合を示す。WTは野生種のものを示し、1-5、1-6及び1-7は形質転換体のものを示す。

この結果、+Fe、-Feのいずれにおいても形質転換していない野生種(WT)よりも形質転換したもののはうが比活性が高く、-Feの時さらに比活性が高くなることがわかった。このことは遺伝子の導入により、NAATの活性が高くなることを示しているのみならず、形質転換体は鉄欠乏状態又は鉄の不溶態化した状態においてNAAT活性が非常に亢進されることを示している。即ち、鉄欠乏状態又は鉄の不溶態化した状態において強い耐性を有する種となっていることが推察された。

以上のことにより、遺伝子 $naat$ を導入することによりNAAT活性が亢進されることがわかったが、これらの形質転換体が実際の鉄欠乏土壌で生育できるかどうかを検討した。35S- $naat-A$ 形質転換イネを鉄の不溶態化したアルカリ土壌に移植すると、移植後2週間目までは葉が黄化してくるが、その後の4~5週間目に新葉が濃い緑になり回復し始めた。第5図のアルカリ土壌に移植

後 8 週目の生育状況の写真を挙げる。第 5 図のコントロール (control) は、ベクターのみを移植した対照のイネを示し、その右側のイネは形質転換したものである。コントロールのものに比べて形質転換体のものの発育が格段に優れていることがわかる。また、アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第 6 図に示す。第 6 図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。黒丸印は形質転換体 15-2 を示し、黒四角印は形質転換体 8-1 を示し、白丸印はコントロールとして用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

前述したように、35S 形質転換イネ 8-1 には少なくとも 5 コピーの *naat* 遺伝子が、また、35S 形質転換イネ 15-2 には少なくとも 2 コピーの *naat* 遺伝子が導入されており、第 6 図の草丈からみれば遺伝子のコピー数には余り関係無く、遺伝子が導入されていればイネに鉄欠乏耐性が付与できることが示されたことになる。

このように、イネのムギネ酸合成経路のなかの酵素の活性を、その遺伝子の導入により高めることができ、さらにそれにより鉄欠乏耐性が与えられることがわかった。

本発明のイネのムギネ酸合成経路のなかの酵素としては、第 1 図に示すムギネ酸類の生合成経路の中の酵素であって、当該酵素をコードする遺伝子を導入することによりその活性が高められるものであればよいが、前記したようにその中のニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) やニコチアナミン合成酵素が好ましい。本発明のイネのムギネ酸合成経路のなかの酵素をコードする遺伝子としては、cDNA であってもゲノム由来のものであってもよい。後述するようにゲノムの使用も本発明の好ましい例である。

したがって、本発明のイネ科植物としては、ストラテジー I I の機構により鉄を吸収することが可能な植物であればよく、学術上のイネ科植物に限定されるものではない。本発明の好ましいイネ科植物の例としては、イネ、トウモロコシ、ソルガム、小麦、大麦、エンバクなどが挙げられる。これらのイネ科植物はその品種に関係なく、広く本発明の方法を適用することができ、目的とする遺伝子が導入されたイネ科植物を作出することができる。

本発明のプロモーターとしては、目的の酵素を発現させることができるもので

あれば特に制限はなく、35Sプロモーター、より具体的にはCaMV35Sプロモーターなどを用いることができる。

本発明のベクターとしては、形質転換において好適に使用することができるものであれば、特に制限はない。本発明の形質転換法としては、前記したアグロバクテリウムを用いる方法に限定されるものではなく、パーティクルガンなどを用いた各種の形質転換法を採用することもできる。また、形質転換されるイネ科植物の細胞としては、前記したカルスからの細胞に限定されるものではなく、各種の細胞を使用することもできるが、通常はカルス由来のものが好ましい。

本発明の鉄欠乏とは、鉄分が欠乏している状態であってもよいが、好ましくは植物が吸収することができる状態の鉄分が欠乏している状態であり、植物の種類に応じて鉄欠乏状態であるか否かを決めるることもできる。したがって、本発明における鉄欠乏耐性とは、目的とする植物がその土壌においては鉄分を吸収するのが困難な状態に対する耐性であるということもできる。

次に本発明者らは、*naat*のcDNAに代えてオオムギのゲノム*naat*の導入を試みた。

ゲノム*naat*は、オオムギ(*Hordeum vulgare* L. var. *Igri*)より抽出したゲノムDNAを用いて作成されたライブラリー(SRTRATAGENE社製)を用いた。このライブラリーは、制限酵素*Sau3A*Iで部分的に切断され、*λFIXI*Iベクターの*Xba*Iサイトに導入されたものである。プローブとしては、先に単離した*naat-A*cDNAの全長を用いた。ホストとしては、大腸菌XL1-Blue MRA(*E. coli* XL1-Blue MRA (P2))を使用した。

スクリーニングの結果、5つのファージが得られ、これらについてそれぞれファージDNAの単離を行い、それぞれについて制限酵素地図を作製したところ、すべて同じ断片を含むことが解った。すなわち、得られた5つのファージは同じゲノムの部分から由来するものであることが解った。また、これらはプローブに使用した*naat*を含むことが予想された。そこで、第7図に示すこのうちの1つについて塩基配列の決定を行った。

第7図に示したファージDNAを、10kb以上の断片を挿入でき、かつアグロバクテリウムを用いたイネの形質転換を行うことのできるプラスミドベクター

p B I G R Z 1 の *N o t I* サイトに挿入した（第 8 図参照）。

さらに、第 7 図に示した断片について 11.0 kb までを、A～D までの 4 つに分け、これらをプラスミドベクター p B l u e s c r i p t SK (-) の *E c o R I* サイト（B、C）、または *N o t I*、*E c o R I* サイト（A、D）に導入した。

A～D の各断片についてプラスミド上の配列を元にしたプライマー（M 13 フォワードプライマー、M 13 リバースプライマー）にて断片の両端から塩基配列を決定した。塩基配列の決定には島津製作所社製 DNA シーケンサー D S Q - 2000 L を使用した。

配列決定の詳細は後述する実施例に記載されている。

決定した 10, 966 bp の塩基配列を配列表の配列番号 1 示す。また、全配列を第 9 図（塩基番号なし）に示した。

得られた塩基配列から、この 10, 966 bp の遺伝子は、これまで得られてきた *n a a t - A* と *n a a t - B* をコードするオオムギゲノムの断片であることがわかった。順序は *n a a t - B*、*n a a t - A* の順であった。

第 10 図に c DNA と比較して決定した *n a a t - A* と *n a a t - B* の 5' 上流、エキソン、イントロン、3' 下流を示した。第 10 図において大文字が c DNA に転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。エキソン部分の塩基番号はそれぞれ以下のようになる。

この模式図を、第 11 図に示した。エキソン部分を斜線で塗った部分で示してある。両遺伝子ともに 6 つのイントロン、7 つのエキソンで形成されている。また、イントロンの挿入位置は、各遺伝子ともに相同の位置であった。c DNA のどの位置にどの大きさのイントロンが挿入されているかを第 12 図に示した。

c DNA から予想される *n a a t - A* 及び *n a a t - B* のアミノ酸配列を第 13 図及び第 14 図にそれぞれ示した。

得られたオオムギのゲノム *n a a t* を導入したイネの形質転換法は、前述した 35 S の形質転換イネの形質転換法に準じて行った。

次に得られたゲノム *n a a t* を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定を行った。得られた再生体（T 1）のうち 39 個体とベクターのみを導入したコントロール

(control) 15 個体を用いて 35S の形質転換植物と同様に検定を行った。移植後 5 週目から、1 週間または 2 週間ごとに草丈の測定を行った。4-5 週間ごとに 2 回土壌サイズを増やしたポットに移し変えた。

ゲノム *n a a t* で形質転換されたイネは、アルカリ土壌に移植後 2 週間目までに葉が黄化し 4 ~ 5 週間目に新葉が濃い緑になり回復し始め、俄然旺盛な生育を示すようになった。これに対してベクターのみを入れた対照区は永く黄化葉が続き、8 週目あたりから新葉の緑化が始まった。

第 15 図は、アルカリ土壌に移植後 10 週間目の生育の状況を移した写真である。

第 15 図の control は、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム *n a a t* で形質転換したものである。

アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第 16 図に示す。第 16 図のグラフの縦軸は草丈 (cm) であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数 (日) を示す。第 16 図の左側はゲノム *n a a t* で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

これにより、ゲノム *n a a t* の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

実施例

次に、具体例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例 1 : CaMV 35S プロモーターで *n a a t* を過剰発現するイネの形質転換法

第 2 図に示すバイナリーベクターを、遺伝子 *n a a t* の cDNA を pIG12 1Hm に *Xba*I 及び *Sac*I 部位を使って組み込んで作成した。これをアグロバクテリウムに導入し形質転換に用いた。

イネの形質転換はヒエイら (Hiei, et al., (1994)) の方法に従い、材料には「ツキノヒカリ」を用いた。まず、糊を取り除いた種子を滅菌して、N 6 無機塩

N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 2 g/L ゲルライト (gelrite) からなるカルス誘導培地 (pH 5.8) に播種し、60 μ mol/m² s で、16 時間明期/8 時間暗期の条件で 25°C、3 週間培養して胚盤からカルスを誘導した。

新しい培地に移し、25°C 明所で 3 日間培養した後、アグロバクテリウム懸濁培地 (pH 5.8) (AA 無機塩 アミノ酸 B 5 ビタミン 20 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 0.2 mg/L、カイネチン (kinetin) 10 mg/L アセトシリソング (acetosyringone)) でアグロバクテリウム懸濁液に浸し、ペーパータオルで水を切った後、共存培養培地 (pH 5.2) (N 6 無機塩 N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 10 g/L、グルコース (glucose) 2 mg/L、2, 4-D 10 mg/L アセトシリソング (acetosyringone) 2 g/L ゲルライト (gelrite)) で 28°C 暗黒下で 3 日間感染させた。

その後、500 mg/L でクラフォランを入れた滅菌水洗浄液でカルスを洗つてアグロバクテリウムを除去し、50 mg/L のハイグロマイシンを含む選抜培地 (pH 5.8) (N 6 無機塩 N 6 ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 2 mg/L、2, 4-D 2 g/L、ゲルライト (gelrite) 500 mg/L、クラフォラン 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin)) 上に置床して 25°C 明所で 3 週間培養した。

培養後、再分化培地 (pH 5.8) (MS 無機塩 MS ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 30 g/L、ソルビトール (sorbitol) 2 g/L、カザミノ酸類 (casamino acids) 1 mg/L、NAA 2 mg/L、BAP 500 mg/L、クラフォラン 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin) 4 g/L、ゲルライト (gelrite)) に移し 3~5 週間で再分化してきた再生体 (T 1 植物) を検定培地に移した。検定培地 (pH 5.8) は、MS 無機塩 MS ビタミン 30 g/L、スクロース (sucrose) 50 mg/L、ハイグロマイシン (hygromycin) 8 g/L、寒天 (agar) からなっている。

シャーレ一杯に大きくなった植物体を 4~5 日間馴化させた後、合成培土 (ボンソル 1 号、住友化学) とバーミキュライトを 1:1 にまぜた土に移植して種子

をとった。最終的に 3 4 系統の形質転換イネを得た。

実施例 2：導入された遺伝子のサザンハイブリダイゼーション法による検出

実施例 1 で得られた T 1 植物の葉を磨碎し、C-TAB 法の改変によりゲノムを抽出した。抽出したゲノムを *Hin d* III で処理し、0.8% アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。これをナイロンメンブレンにプロッティングした。プローブに *naat* の内部配列で作成したプライマーを用いて PCR によって ^{32}P でラベルしたものを用いてハイブリダイゼーションを行った後、BAS 2000 (フジフィルム) によってバンドを検出した。

このサザンハイブリダイゼーションの結果を第 3 図に示す。第 3 図の WT は野生型のイネの場合を示し、control はベクターのみを導入した対照のイネの場合を示し、1-5、1-6、1-7、8-1 及び 15-2 は 35S プロモーターで *naat-A* を過剰発現するイネの場合を示す。

第 3 図に示す結果より、35S 形質転換イネのうち、8-1、15-2 には少なくともそれぞれ 5 コピー、2 コピーの *naat* が導入されたことが分かった。

実施例 3：アルカリ土壌を用いた鉄欠乏耐性の検定

供試土壌として、次の構成成分からなる貝化石土壌を用いた。

構成成分 (%) ; 水分	0.48
リン酸全量	0.12
カリ全量	0.12
ケイ酸全量	22.79
石灰全量	37.82
苦土全量	0.91
マンガン全量	0.018
ホウ素全量	0.003
アルカリ分	38.80
塩酸不溶解物	28.88

酸化鉄	0.99
酸化アルミニウム	5.59
亜鉛	0.002

この土壤の可溶性の鉄濃度は2.2 ppmであり、pHは8.78であり、電気抵抗は0.03 mΩであった。

35Sの形質転換植物の検定には、最初に得られた形質転換植物の再生体（T1）の種子を50mg/Lのハイグロマイシンを含むMS固体培地上に播種して選抜、馴化後、20~25cmになった幼植物（T2）を用いた。

34系統のうちの16系統27種について耐性の検定を行った。検定法はプラスチックの黒ポット（0.5L）の底にペーパータオルとろ紙を円形に切ってしき、アルカリ土壌を入れたものに植物を移植し、水耕液（春日井氏液； 7×10^{-4} M K_2PO_4 , 1×10^{-4} M KCl , 1×10^{-4} M KH_2PO_4 , 2×10^{-3} M $Ca(NO_3)_2$, 5×10^{-4} M $MgSO_4$, 1×10^{-5} M H_3BO_3 , 5×10^{-7} M $MnSO_4$, 5×10^{-7} M $ZnSO_4$, 2×10^{-4} M $CuSO_4$, 1×10^{-8} M $(NH_4)_3MOO_2$, 1.5×10^{-4} M Fe-EDTA）をポットの底から2~3cm浸し、昼30°C、夜25°Cの温室で栽培した。アルカリ土壌は3~4週間後にポットのサイズを1Lにし、8~9週間後に2Lと一回りづつ大きくして植え替えた。移植後2週目から、1週間または2週間ごとに草丈の測定を行った。

+Fe（鉄存在）又は-Fe（鉄欠乏）の水耕液で育てた形質転換イネ（35S-nataイネ）のNAAAT比活性の測定を次のようにして行った。発芽後3週間の幼植物（T2）を+Fe、-Feの水耕液で2週間栽培しそれぞれの根におけるNAAAT活性を測定した。その結果を第4図に示す。第4図の白抜き部分は+Feの場合を示し、斜線部分は-Feの場合を示す。WTは野生種のものを示し、1-5、1-6及び1-7は形質転換体のものを示す。

+Fe、-Feのいずれにおいても形質転換していない野生種（WT）よりも形質転換したもののほうが比活性が高く、-Feの時さらに比活性が上乗せされた（第4図参照）。

実施例 4：アルカリ土壌による鉄欠乏耐性の検定

35S-naat-A形質転換イネをアルカリ土壌に移植して、その生育を観察した。

35S-naat-A形質転換イネは、移植後2週間目までに葉が黄化し4～5週間に新葉が濃い緑になり回復し始め、naatの導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

移植後8週目の生育状況の写真を第5図に示す。第5図のcontrolは、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネは形質転換したものである。

アルカリ土壌移植後の草丈の変化を第6図に示す。第6図のグラフの縦軸は草丈(cm)であり、横軸はアルカリ土壌移植後の日数(日)を示す。黒丸印は形質転換体15-2を示し、黒四角印は形質転換体8-1を示し、白丸印はcontrolとして用いたベクターのみを移植した対照のイネを示す。

遺伝子naatの導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった(第5図、第6図)。

実施例5：naat-A及びBゲノミッククローンの単離

スクリーニングの手順は主に「クローニングとシーケンス」(農村文化社)によった。

ライブラリーとして、ストラタジーン(SRTRATAGENE)社より購入したλFIXIライブラリーを用いた。これはオオムギ(*Hordeum vulgare L. var. Igri*)より抽出したゲノムDNAを用いて作成されたものである。ゲノムDNAは、制限酵素Sau3AIで部分的に切断され、λFIXIIベクターのXhoIサイトに導入されたものである。ライブラリーのインサートサイズは9～23kbである。

(1) NZCYM液体培地(NZアミン 10g、NaCl 5g、カザミノ酸 1g、バクトイースト抽出物(Bacto-yeast extract) 5g、MgSO₄·7H₂O 2g、及び、1N NaOH 約6mLを蒸留水で1Lにし(pH 7.

5) オートクレーブで殺菌したもの。) で一晩培養した大腸菌 (E. coli XL1-Blue MRA (P2)) を遠心した後、10 mM MgSO₄ 溶液 20 mL に懸濁した。

(2) この大腸菌懸濁液 100 mL とファージ希釀液 (スクリーニング用プレート (9 cm x 13 cm) に 25,000 プラークを形成する量) 100 mL とを混ぜ、37°C 20 分静置後、8 mL の 50°C 0.7% トップアガー (100 mLあたり 0.7 g のアガロースを加えたもの) と混ぜ、スクリーニング用プレート (9 cm x 13 cm) にまいた。プレートは 37°C に静置し、プラークのサイズが 0.5 mm になるまで培養した。

(3) ナイロンメンブレン Hybond-N (Amersham社) をプレートのサイズに切り取り、トップアガロースの上に 30 秒間おいた。これを変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) を含ませた濾紙の上にプラークと接触した面を上にして置いた。2 枚目のメンブレンをトップアガロース上に置き、1 分間放置した。同様に変性液をしみこませた濾紙上において。5 分間放置した後、2 枚のメンブレンを中和液 (0.5 M Tris-HCl pH 8.0、1.5 M NaCl) をしみこませた濾紙上に移した。5 分間放置後、2 x SSPE (0.02 M Na₂PO₄ pH 7.4、0.3 M NaCl、2 mM EDTA) 液で 2 回よく洗い、乾燥させた。

(4) 先に単離した *naat-A* の cDNA 全長をプローブとして使用するために、プラスミドベクター pYH23 の *Hind* III 及び *Not* I サイトに入っているものを同サイトで切り出し、精製した。これをランダムプライマー DNA ラベリングキット第 2 版 (Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 (宝酒造)) を用いて [α -³²P] dATP でラベル化した。

一方、メンブレンを予め 65°C に加温しておいた 30 mL のハイブリダイゼーションバッファー (6 x SSPE、5 x デンハルト溶液、0.1% SDS、100 mg/mL 変性サケ精巣 DNA) でプレハイブリダイゼーションを 65°C で 1 時間行い、ハイブリダイゼーションバッファーを交換した (25 mL)。

これに、前記で調製したプローブを加え、65°C で 12 時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄は予め 65°C に加温しておいた洗浄液 (5 x

SSPE) で 65℃で 10 分間を 2 回、ハイストリージェント (high stringent) 洗浄液 (2 x SSPE, 0.1% SDS) 65℃で 1 回を行った。メンブレンをサランラップで包み、イメージングプレート (フジフィルム) に一晩感光させ、イメージングアナライザ (フジフィルム) で結果を得た。

試薬は、20 x SSPE (0.2M NaH₂PO₄, pH 7.4, 3M NaCl, 20 mM EDTA)、50 x デンハルト溶液、5g フィコール 400、5g ポリビニルピロリドン (MW 360,000)、5g 仔ウシ血清アルブミンを 500 mL の蒸留水に溶解し、0.45 mm のフィルターで濾過したものを使用した。

(5) 二枚のメンブレンに共通して現れたものをポジティブとして、この場所に対応するブラークを元のシャーレから打ち抜いた。打ち抜いたものは SM 液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M NaCl, 7 mM MgSO₄, 0.01% ゼラチン) にとり、4℃で保存した。その後、このファージ液を使って同様に 2 次、3 次スクリーニングを行った。最終的に 5 つのファージが得られた。

上記で得られた 5 つのファージについてそれぞれファージ DNA の単離を行った。それぞれについて制限酵素地図を作製したところ、すべて同じ断片を含むことが解った。すなわち、得られた 5 つのファージは同じゲノムの部分から由来するものであることが解った。また、これらはプローブに使用した *naat* を含むことが予想された。そこで、このうちの 1 つ (第 7 図参照) について塩基配列の決定を行うこととした。第 7 図中の E は *EcoRI* を、H は *HindIII* を、B は *BamHI* を、N は *NotI* をそれぞれ示す。両端の *NotI* サイトは *IXI* のアームにある *NotI* である。

実施例 6 : サブクローニングと塩基配列の決定

(1) 第 7 図に示したファージ DNA を、10 kb 以上の断片を挿入でき、かつアグロバクテリウムを用いたイネの形質転換を行うことのできるプラスミドベクター pB1GRZ1 に挿入した。第 7 図で示したファージ DNA のはじめの *NotI* サイトから 11.0 kb にある *NotI* サイトまでの断片 11.0 kb

pを切り出し、pBIGRZ1のNotIサイトに挿入した（第8図参照）。第8図のNPTIIはカナマイシン耐性遺伝子を、HPTはハイグロマイシン耐性遺伝子を、GUSはイントロン入りβグルクロニダーゼ遺伝子を、LacZはβガラクトシダーゼ遺伝子を、35Pは35Sプロモーターを、NPはNOSプロモーターを、NTはNOSターミネーターを、MCSはマルチクローニングサイトを、Ri oriはRiプラスミド複製起点をそれぞれ示している。

すなわち、塩基配列の決定を行ったのは、この11.0kbについてである。後のイネの形質転換にはこの作成したコンストラクトを使用した。

(2) pBIGRZ1は大腸菌(E. coli XL1-blue)内で安定に保持される。このコンストラクトを持った大腸菌を培養し、ここからプラスミドをプラスミド調整器PI-50α（倉敷紡績株式会社）により抽出した。

(3) 第7図に示した断片について11.0kbまでを、A～Dまでの4つに分け、これらをプラスミドベクターpBluescript SK(-)のEcoRIサイト(B、C)、またはNotI、EcoRIサイト(A、D)に導入した。

(4) A～Dの各断片についてプラスミド上の配列を元にしたプライマー(M13フォワードプライマー、M13リバースプライマー)にて断片の両端から塩基配列を決定した。塩基配列の決定には島津製作所社製DNAシーケンサーDSQ-2000Lを使用した。

(5) 各断片について塩基配列の決定された部分からさらに先を読むためのプライマーとそこまで読めた配列を逆方向から確認するためのプライマーを作成し、順次塩基配列を決定した。最終的には全ての断片について、5'方向からと3'方向から両方向について配列決定を行った。各断片の塩基配列を決定するのに使用したプライマーの配列を以下に示す。

これらのプライマーは、DSQ-2000Lでの使用のため5'末端にフルオレセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate, FITC)でラベルした。

断片A用のプライマー

名称:配列 F-A1F: FITC-5'-gct act agt agt att cct ggt gta g
 名称:配列 F-A1R: FITC-5'-gga gta cta cta gac tac acc agg a
 名称:配列 F-A2F: FITC-5'-aca tgc gca tgc atg aat tgc cg
 名称:配列 F-A2R: FITC-5'-caa ttc atg cat gcg cat gtg cc

断片B用のプライマー

名称:配列 F-B1F: FITC-5'-ggt caa gta tgc agt atg ttg gaa c
 名称:配列 F-B1R: FITC-5'-gtt cca aca tac tgc ata ctt gac c
 名称:配列 F-B2F: FITC-5'-cta gaa gcc tat gga tgt ttc ttt tgg
 名称:配列 F-B2R: FITC-5'-cca aaa gaa aca tcc ata ggc ttc tag
 名称:配列 F-B3F: FITC-5'-agt tct tat caa ttt ccg aga tga c
 名称:配列 F-B3R: FITC-5'-ata gtc atc tcg gaa att gat aag a
 名称:配列 F-B4F: FITC-5'-agt ggt cac cat gcg gac caa cac c
 名称:配列 F-B4R: FITC-5'-ggg gtt ggt ccg cat ggt gac cac t

断片C用のプライマー

名称:配列 F-C1F: FITC-5'-cac cgg cca gtt caa ctg cta cgc
 名称:配列 F-C1R: FITC-5'-gcg tag cag ttg aac tgg ccg gtg
 名称:配列 F-C2F: FITC-5'-ttt gga gga gat cca tga cga cat a
 名称:配列 F-C2R: FITC-5'-tat gtc gtc atg gat ctc ctc caa a
 名称:配列 F-C3F: FITC-5'-tct tct cat atg cta ctg tgg gga t
 名称:配列 F-C3R: FITC-5'-tga cat gca aca cag gga cat gag c

断片D用のプライマー

名称:配列 F-D1F: FITC-5'-cat gct gac gaa gag cga ggt cat a
 名称:配列 F-D1R: FITC-5'-ccc agg ata tga cct tag tgg ttg g

(6) 上で完全に配列決定ができなかった部分について新たに下に示すプライマーを合成し、パーキンエルマージャパン社製自動DNAシーケンサーABI PRIS

MTM 310 genetic Analyzerを使用して、完全に塩基配列を決定した。

断片B用のプライマー

名称:配列 B5F: 5'-gaa tgg caa act ggg tcc gca tta c
 名称:配列 B5R: 5'-gtt atg cgg acc cag ttt gcc att c
 名称:配列 B6F: 5'-ctg gtt gtt gtg gcc tgg acg aaa c
 名称:配列 B6R: 5'-gtt tcg tcc agg cca caa caa cca g
 名称:配列 B7F: 5'-agc aca aac cct acc tat gtt agg c
 名称:配列 B7R: 5'-gcc taa cat agg tag ggt ttg tgc t

断片C用のプライマー

名称:配列 C4F: 5'-tgg aat ttc gcc cgg ggc aag gac
 名称:配列 C4R: 5'-ccc tgt gac aag tgc tct gct acg
 名称:配列 C5F: 5'-tct ggg atc tca gtg cat cca aca
 名称:配列 C5R: 5'-gaa gca tat atc agt caa aca taa cc

また、断片Aと断片B、断片Bと断片Cのつなぎ目部分を確定するために以下のプライマーを作成して、(1)で作成したコンストラクトをパーキンエルマーリヤパン社製自動DNAシーケンサーABI PRISMTM 310 genetic Analyzerを使用して、塩基配列を決定した。

断片Aと断片Bの境目

名称:配列 A-eF: 5'-cac atc ctt tgc ctt gct gaa tat gg
 名称:配列 B-tR: 5'-cag tag tac taa tta atc acc tta gta gc

断片Bと断片Cの境目

名称:配列 B-eF: 5'-cac gat caa cca aag aat gtc ctc c
 名称:配列 C-tR: 5'-tac ttg tat atg cag ctc cag cac

(7) 決定した 10, 966 bp の塩基配列を配列表の配列番号 1 示す。また、全配列を第 9 図（塩基番号なし）に示した。

得られた塩基配列から、この 10, 966 bp の遺伝子は、これまで得られたいた *naat-A* と *naat-B* をコードするオオムギゲノムの断片であることがわかった。順序は *naat-B*、*naat-A* の順であった。

第 10 図に cDNA と比較して決定した *naat-A* と *naat-B* の 5' 上流、エキソン、イントロン、3' 下流を示した。第 10 図において大文字が cDNA に転写されていたエキソン部分を示し、小文字がそれ以外の部分を示している。エキソン部分の塩基番号はそれぞれ以下のようになる。

naat-B 第 1 エキソン 579-1299 (開始コドン 6518)

第 2 エキソン 1483-1825

第 3 エキソン 1922-2140

第 4 エキソン 2244-2303

第 5 エキソン 2761-2916

第 6 エキソン 3263-3356

第 7 エキソン 3735-4033 (終始コドン 3868)

naat-A 第 1 エキソン 6457-6897 (開始コドン 6518)

第 2 エキソン 7029-7371

第 3 エキソン 7479-7697

第 4 エキソン 7784-7843

第 5 エキソン 8285-8440

第 6 エキソン 8738-8831

第 7 エキソン 9414-9732 (終始コドン 9547)

この模式図を、第 11 図に示した。エキソン部分を斜線で塗った部分で示してある。両遺伝子とともに 6 つのイントロン、7 つのエキソンで形成されている。また、イントロンの挿入位置は、各遺伝子とともに相同の位置であった。cDNA の

どの位置にどの大きさのイントロンが挿入されているかを第12図に示した。

cDNAから予想される *naat-A* 及び *naat-B* のアミノ酸配列を第13図及び第14図にそれぞれ示した。

実施例7：オオムギのゲノム *naat* を導入したイネの形質転換法

前記した実施例6で得られたオオムギのゲノム *naat* を導入したイネの形質転換法は、以下に示す(1)～(3)の点を除いては35Sの形質転換イネのときと同様に形質転換を行った。

(1) カルス誘導を28℃暗所で行い、カルス誘導培地を、

N6無機塩 N6ビタミン 0.3g/L、カザミノ酸 (casamino acid) 30g/L、スクロース (sucrose) 2mg/L、2,4-D 2.8g/L、ブロリン 4g/L、ゲルライト (gelrite) (pH 5.8) とした。

(2) アグロバクテリウムによる感染を25℃で行い、共存培養培地を、

N6無機塩 N6ビタミン 30g/L、スクロース (sucrose) 10g/L、グルコース (glucose) 1g/L、カザミノ酸 (casamino acid) 2mg/L、2,4-D 20mg/L、アセトシリンゴン (acetosyringone) 2g/L、ゲルライト (gelrite) (pH 5.2) とし、ろ紙を敷いて行った。

(3) 選抜は、はじめの1週間を10mg/L、次の1週間を30μg/L、最後の2週間を50mg/Lのハイグロマイシンを含む選抜培地を使い、暗所28℃で培養した。

選抜培地として、N6無機塩 N6ビタミン 1g/L、カザミノ酸 (casamino acid) 30g/L、スクロース (sucrose) 2mg/L、2,4-D、250mg/L クラフォラン、10-50mg/L ハイグロマイシン (hygromycin)、2g/L ゲルライト (gelrite) (pH 5.8) を用い、

再分化培地として、MS無機塩 MSビタミン 30g/L、スクロース (sucrose) 30g/L、ソルビトール (sorbitol) 2g/L、カザミノ酸 (casamino acid) 1.1g/L、MES、2mg/L NAA、1mg/L カイネチン (kinetin)、250mg/L クラフォラン、50mg/L ハイグロマイシン (hygromycin)、4g/L ゲルライト (gelrite) (pH 5.8) を用い、

28℃で培養を行った。

実施例8：ゲノム*n a a t*を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定

ゲノム*n a a t*を導入したイネの鉄欠乏耐性の検定は、得られた再生体（T1）のうち39個体とベクターのみを導入したコントロール（control）15個体を用いて35Sの形質転換植物と同様に検定を行った。移植後5週目から、1週間または2週間ごとに草丈の測定を行った。4-5週間ごとに2回土壤サイズを増やしたポットに移し変えた。

ゲノム*n a a t*で形質転換されたイネは、アルカリ土壤に移植後2週間目までに葉が黄化し4~5週間目に新葉が濃い緑になり回復し始め、俄然旺盛な生育を示すようになった。これに対してベクターのみを入れた対照区は永く黄化葉が続き、8週目あたりから新葉の緑化が始まった。これにより*n a a t*の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった（第15図及び第16図参照）。

第15図は、アルカリ土壤に移植後10週間目の生育の状況を移した写真である。

第15図のcontrolは、ベクターのみを移植した対照のイネを示す。右側のイネはゲノム*n a a t*で形質転換したものである。

アルカリ土壤移植後の草丈の変化を第16図に示す。第16図のグラフの縦軸は草丈（cm）であり、横軸はアルカリ土壤移植後の日数（日）を示す。第16図の左側はゲノム*n a a t*で形質転換したイネであり、右側はベクターのみを移植した対照のイネである。

これにより、ゲノム*n a a t*の導入によりイネに鉄欠乏耐性が付与できたことがわかった。

産業上の利用可能性

本発明は、鉄欠乏耐性を有する新規なイネ科植物を提供するものであり、鉄欠乏耕地においても生育可能な新規なイネ科植物を提供するものである。

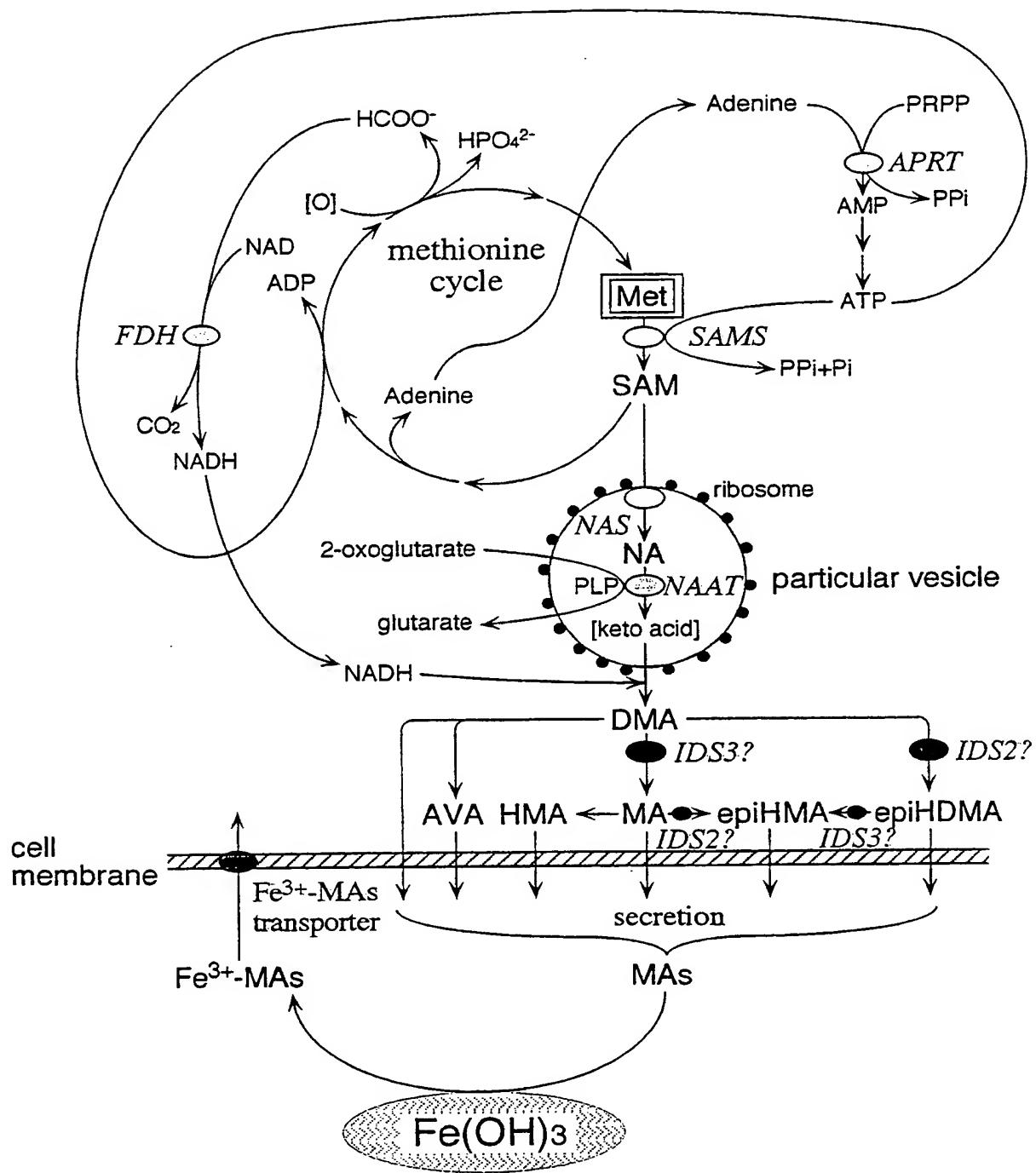
また、本発明は、イネ科植物に、ムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入することにより、鉄吸収性が改善されたイネ科植物をえることがで

きるという新規な知見を提供するものである。

請 求 の 範 囲

1. イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を作出する方法。
2. 酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) であり、それをコードする遺伝子が *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
3. プロモーターが C a M V 3 5 S である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の方法。
4. 導入される遺伝子がゲノム遺伝子である請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の方法。
5. ゲノムがオオムギのゲノム *n a a t* である請求の範囲第 4 項に記載の方法。
6. 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 1 で示される塩基配列、若しくは当該塩基配列にストリージェントな条件でハイブリダイズ可能かつニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) 活性を有する蛋白質を発現し得る塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列である請求の範囲第 5 項に記載の方法。
7. 請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれかの方法で製造され得る鉄欠乏耐性を有するイネ科植物。
8. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の種子。
9. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の細胞。
10. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物を鉄欠乏耕地で育成する方法。
11. 請求の範囲第 10 項に記載の方法により得られたイネ科植物の作物。

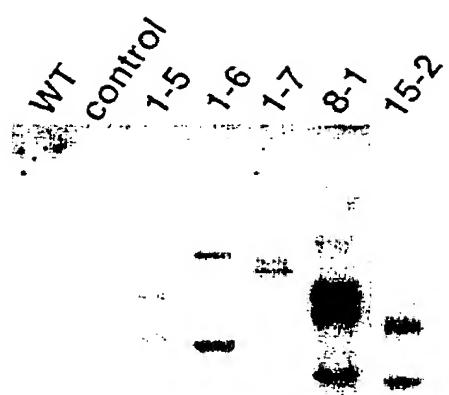
第 1 図



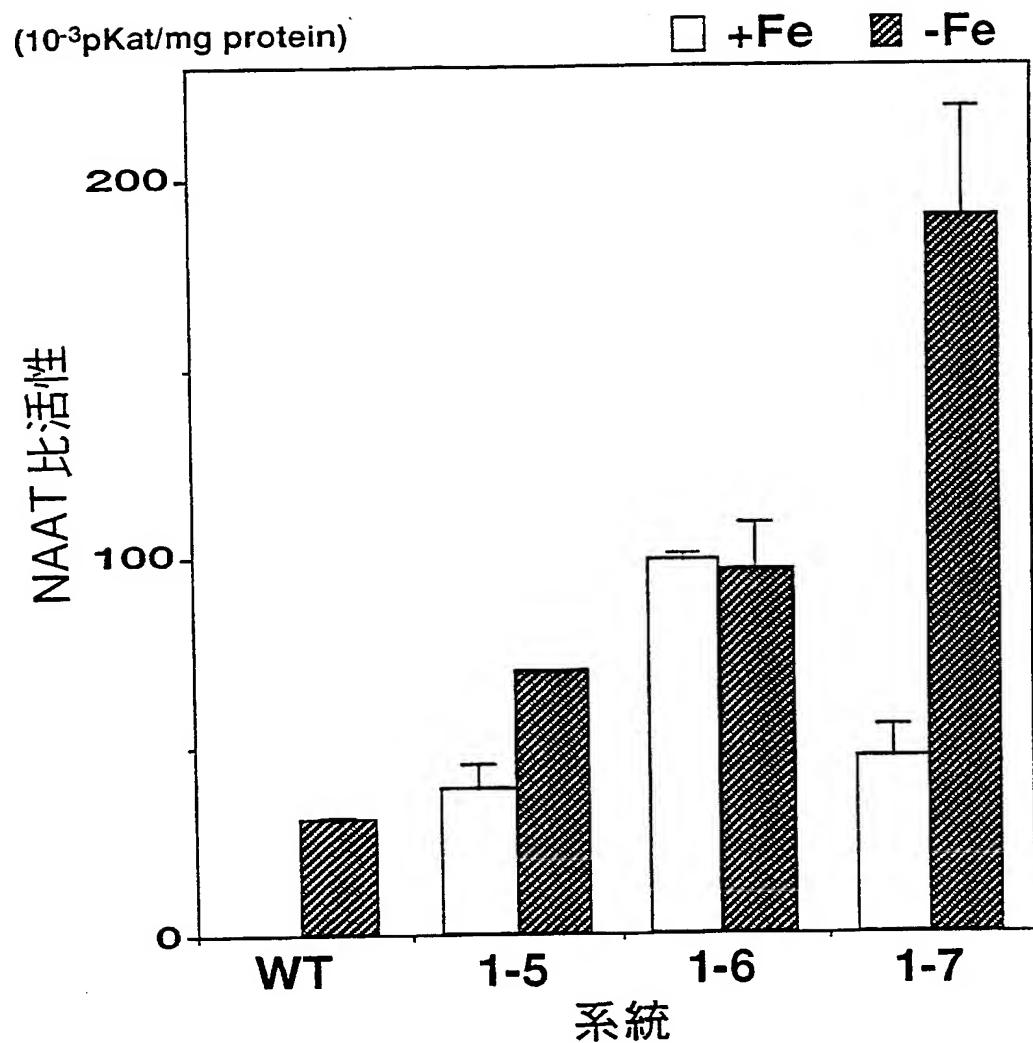
第 2 図



第 3 図



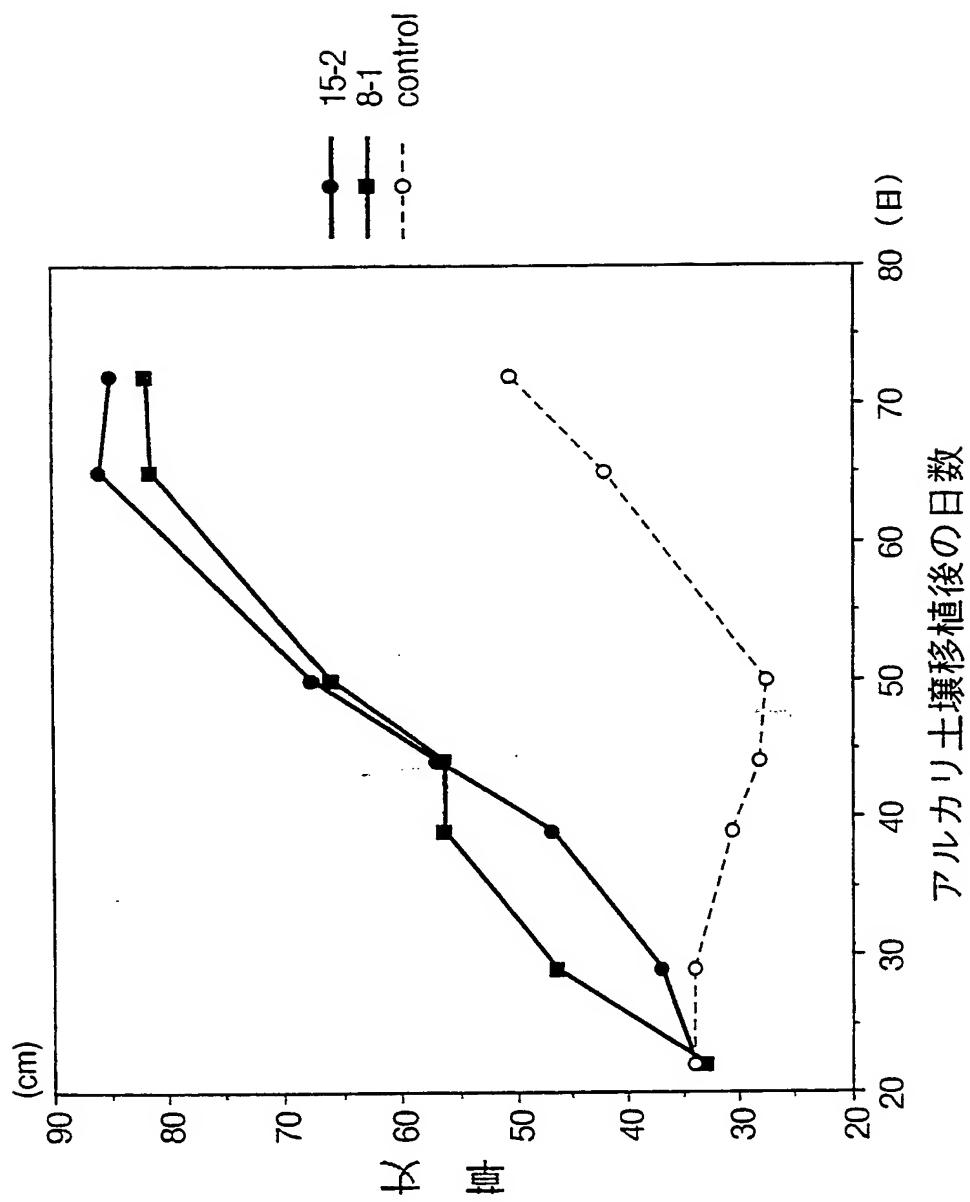
第 4 図



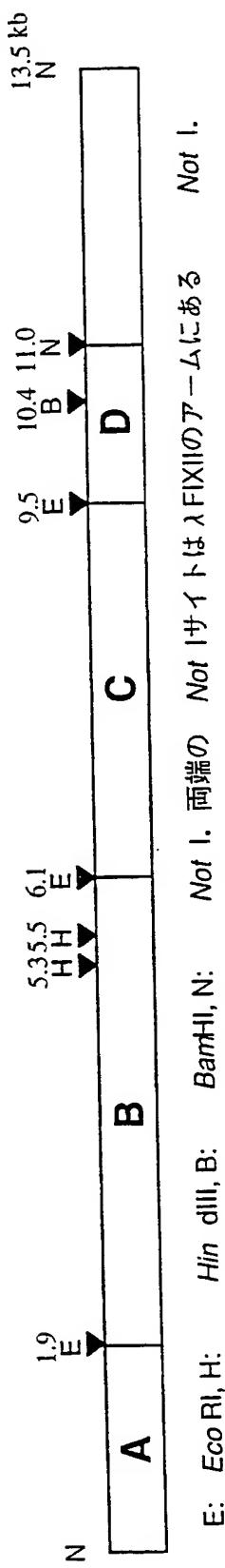
第 5 図



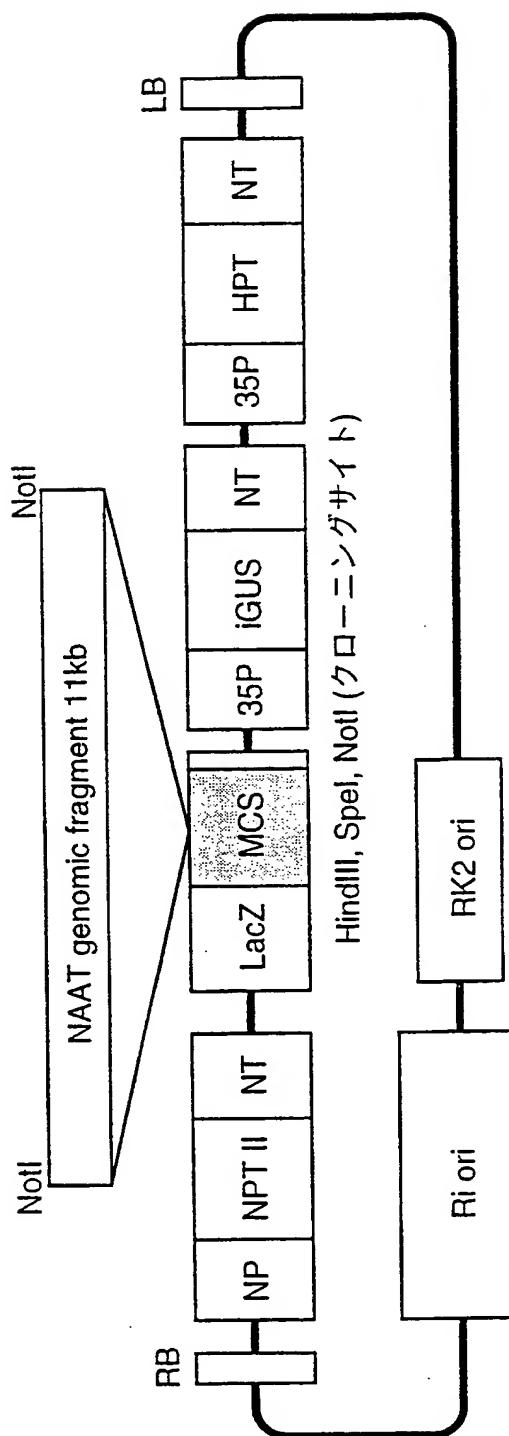
第 6 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

CTCGATCCCATTGCAATGGTATGATTAGCTATCAAACGAAAGAAAGAGATGGCATGTGCC
CTGTGTGTCATCCCTCACTGGCTTGGGAATGGCGATACCGAGTTAGGTAGAGTGT
TTAGCATGATGTCGCCGGCACTGCCAAGAAAACGCGAGCTGAGTGGGTGCACTAACTGAACCCAATCA
GAGCGATGCATGCTTGTGATGAGCGGAGCTGAGTGGGTGCACTAACTGAACCCAATCA
GCATTGGGTGAGTCGAGTCGAGAAGCATCATGCTCCTCGCTCCGATCCGCTTATCTT
TTCTCCCAAATTATAAGAGGGATAGATGATGGTGTGCTGGGTTGGTAGAGTACGTGC
ATAGAACCAAAGCGAGGCGCCGAAAATATGCCGGGATAATGGTGGCAGGCCAACGGC
CACGCCCGTCAGCTGGCAGCGGCGTGCAGAGCGTGCAGCGTGCCTGCGTGC
TCTTGCTGCCGGCCCGGTTCTGTCGCGGTAGAGCAACGGCTATATAGGACCGTCAATC
ACCGCTACTCAATCCGTCCTCCAACTCGTTCTATTACCGCTACTAGTAGTATTCCCTGGT
GTAGTCTAGTAGTACTCCTCCTCCTCCTACCCGTTCCATGGCCACCGT
ACGCCAGAGCGACGGAGTCGCCGCAACGCCCTGCCGTGGCGCAGCCGCAACGGCA
GAGCAACGCCATGGCGTGGCTGCCCGTGAACGGCAAGAGCAACGCCATGGCGTGG
TGCGACCGAACGGCAAGAGCAACGCCATGGCGTGGCTGCCGACCGAACGGCAAGAG
CAACGCCATGCCGAGGCCACTGCAACGCCACGGCAGGCCACTGCAACGGCAAGAC
CAACGCCACCGCAGAGCAACGCCATGCTGAGGCCCGACGCAACGCCAGAGCAA
CGAGCATGCCGAGGACTCCGCGCAACGCCAGAGCAACGCCATGCCGGCG
AGAGGAGGAGGAGGCCGTGGAGTGAATTGCGGGTGCAAGGACGGCGTGTGGCG
GACGGGGCGAACATGAGCATCCGGCGATACGGTACAAGATCAGCGCAGCGTGCAGGA
GAAGGGGCCGCGGCCGTGCTGCCGCTGGCCCACGGGACCCGTCCGTGTTCCCGCCTT
CCGCACGCCGTGAGGCCAGGACGCCGTGCCGCGCTGCGCACCGCCAGTTCAA
CTGCTACCCCGCCGGCGTGCCTCCCGCAGAAGGTAACAACAACAACACAA
GAACAATTCTCTTTCGCGTGTGTCGCGCGCAATCCATGCAATGCCATGTGCCGCT
TTCACGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
GACCTTCTCCCACCTTATACCAAACAAAACAAAAACACAGCGCCGTGGCAGAGCACCT
GTCGCAGGGCGTGCCTACATGCTATCGCCGACGACGTCTCCTCACCGCCGGCG
CCAGGCATGAGGTATAATCCGGTCTGGCCCAGACGCCGGCCAACATTGCT
CCCCAGGCCAGGCTACCAAACACTACGAGGCCGCGCGTCAACAGGCTGGAGGTCCG
GCATTTGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGAGATCGACATCGACTCGCTGAAATCCAT
CGCCGACAAGAACACCACCGCATGGTCATCATAAACCCCAACAACCGTGC
TTACTCCTACGACCATCTGTCAGGTTACATCCTTGCCTTGCTGAATATGGATTCA
GTTCAGTGCACCTGCTGAATTCTTTGCAATCGCATACTGACTGATGTTGCTCAATT
GGTCGCGGAGGTGGCAAAGGCTCGAATATTGGTATTGCTGACGAGGTATACGGCAA
GCTGGTTCTGGCAGGCCCGTTCACTCCAAATGGAGTGTGTTGGCAGATC
GCTGTCCATAGGGTCTCTGTCAGTCAAGTCAAGGATGTTGGGATGGCGGCTGG
AGCGGTGTACGACCCAGAAAGATCTACAGGAAACTAAGGTACTTAAATCTATATCA
TTCTTTCAAATGCTACTAAGGTGATTAATTAGTACTACTGTACAATATATTGCTAAAT
TTGTAATGACATTGGTAGATCTCTACATCAATTACGAATTACCTCAATGTCTCGA
CAGACCCAGCAACCTTCATTCAAGGTCAAGTCTTGGTATTACCTCGTTCAAGAAATAAA
GTCTTTGGTATTACTCCTCTGTCTATTGCTCCGGTCCCTATGTTGAGGCAGCC
CACGTGCATGTCAAGTGACCGTTTGCTTGCATGGATAGTGCCTGGATGGCG
ACACTGTAGTTATTACCTTGTGTTGCTTGCATGGATACCGATAAAATAAAAA
CTGAACCTACTGTTGAATATAACCAGTCAAGGATACATGATTGCACTATGGG
CATGCCATATTCTTGGTCAAGTATGCACTGTTGAACTCTTTAGAAAATAGAT
ACATTGTAATGAGTATACCAATTATTAAGAATTTCATATTGATATCCTTGATGGT
ATTGTTCTCTGTGATTCAACGATTACTTGTGGTTTTGTACTATCAAATTGTCAG
GCAGCTTCTCAGATTCTGAGAACACAAAGGAAGATTCTTAAAGGCATTATTGGT
CTGCTAAAGGAATCATCAGAGATATGCTACAAACAAATAAGGAAACAAATACATTACA
TGTCTCACAAGCCAGAAGGATCAATGTTGTCATGGTAAGCCTATTTGTGAAGTAAA
AAATCTAGGGAGTGTCAATCATAACCTTATATAGGATTAATCTGGGACCGAA

ATGCATCCAACATAATTACTCAAATTCAAATTACATTCTCCGTACATATT
TGAAGATGCATGTATTTAAGAATAATGACGAGAGCTAAAGTTATGCTACGACTAATCAT
CTGGATATCCTTGTCCATCTTTGTTACTCTGGAATGTTAATGGTCAAATCATATT
ACACAAATATCCATGCTAGTTCTAGAAAGATTGATTATTTCTGTAACCATGAACCTCC
GTATTAACTTCCATGTAACACAGGTGAACTGAACCTACATCTTGGAGGAAATAGACGA
TGACATTGATTTGCTGCAAGCTCGAAAAGAAGAATCAGTAATCTTATGCCAGGTAG
GAATCCATTGTTGATTTGACTGTATATGAAGTCTTATCAATTCCGAGATGACTATA
CATATAAAATGATTACCATATTATGGTCAGAAATTGTTAAACAGTGTAGAATATTCTGTG
AAGACTTTTAACACAATATTCTGTAAGACTAGATATCATGTAATTCTCCTGTTTC
TTGACCTGATGTCCTCGTCACATGTTGCTCCTCACAAAAAAATAGCAAGCACATGTT
TCAAATAATTGTTAATAATATAATTAGCCTTAATTATGTTCTATTGAGATAT
TTTGTTAGTCAAACCTATATATTGTGACTATTCTCAAAAACAAACTTATATATGTGTG
CCTCTCAAATGTAGGGAGTGTCTTGAATGGCAAACGGGTCCGCATTACTTTGCTTG
TGTCCATCTCTTCAAGATGGCTCGGAAGGATCAAATCATTCTGTCAAAGGAACAA
GAAGAGAAATCGAGCGATGATTGCTAGTTGTTATCTGACTGAAGCTGAAATCATTCC
CAGTATCCCCATCTATATCTTCAATAAAATGGAACCTTTAGTTCTATGAATAGAAGT
CAACATCTCCTGAATATGTTCTGGTTGTCGGCCTGGACGAAACATAGTGAATGTTAT
GTTAGTGAAGTTACATTGGCGTCGAAGATCTTGAAGTTTTTTTTGGGGGGGG
GGGGGGGGGGGTGCTTGATATTACTCTTAAGTACACGTTCTCTCAAGTTATGTCAAAGCA
CTTGTAACAATTGTAGATTGGTATCATGATATGGATTAAACTAGTCAGATACTTGGT
AAGCACAAACCCCTACCTATGTTAGGCTCACTAAGGTGGCGTTGGTTCGAGAGAGAGGAA
GGATCAGTTGATGATATCCCCAATCATCGAAGTAAATCATGTTGCTACCACTTT
CTACAATCCTAGTAGCTGCATGCGTTGAGCTACTGATCAACACCAGCACACCATA
CTCTGTCAAATCGGCACCCAAAGATTACATCTCACAGCTGAAGCAACCACCAAATTG
AAGAGAGAACCCCTACAAAGACCTTGAGTGGCCACAACTCCAACGGGGAGCACGTAC
TCGCAGGGCGGGAGTGGTCACCATGCGGACCAACACCAACTCCAACGGGGAGCACGTAC
CGATTACTGAAATTCCCCAAACAATTCTTAATTGTAACAAAATTAAAACAGGAACA
ATTTTGAAATTGTAACAAATTAAACGGGTATTCTGAACATTTCAAAATTG
GATCAAATTTAAACGACTTCTTCTCAAATTGAGCAATATTAAAATTATAAAAAA
GTTCAACAATTGAACTTTAAACGAACTTTGAAATTAGCGAGAACATTGAAATTCTAAATT
CGAATTGGAACATTCTTCTATTCTGAACAAAATTGAAAATACGAACGTAATTGGA
ATAAATTTCGAAAATGCGATTCTTGAACATATTGAAAACAAAAAA
CTTAAAGGTAAAATAAAATAAAATAGAAACATAAAAATAAGCAAAAAAA
AAAGAAATCCGAGAAAAGCCAATGGGAATAGCACATGGAAAAACCCAGCCGCCCG
ACTGTGTAAGCTATAAGTGAGCCGGCCAAGCCTCGTCGTCATCATACCTGTGCGA
AACCCCGACAATTGCGTTGCACTATGCGGCGAATAGGCTTCCAGGAGCTCTGCTTCC
GGTTATGGGTCTTGCACACCCCTCTCCACTTGGGCCAGGCTATTATACTTTTCC
TTCTTCTGACCTCACGTTACTACGCCAGTTAGTTTGGAGCGACCAACCGGTTTGT
GAAGGTTCTAGAAACTCAACCATTGGAGCTTCTAGAAGCCTATGAATGTTCTT
TGGACATGTATTATTGTTCTTCTCAAATTGCAACATCTTCTCAAATTCT
GATTTTGTGAAACTGTGATTGGTCTTCTAAATGAACATTGTTGCAAGATCGATGATCCT
TTCAATGAGCGATTCTTCTAAATATCCACATATTTCATATTCAAGCTTCC
TTTAATCGTAACATCTTAGCATTGGTGAACATTATAATTCTTATAAAATGA
TTTTTTCTAAAGCCAACGGTTAACGGTTGACCGCTGAACCACAACCAACGGGGA
AACCATGACTCGCTGAACAGGGCAGGGCTTCTATGATTGGTGGCTAATACCAGCG
CCCTGACTACTAACGAAGGAATTGCAAATTACCAACCAACTACTATGGTAAAAATG
AATATCACGATAAAAAGGGAAAAAAACTATACCTGAAAATCCCTCTGTTCTAAAT
ATTGTTGTTGGGAGAACTAATCTGAAAGAACTAATCTAGTTCTCCGCAATAACAAATA
TTATGATTGGGGAGTATAACTATTACACGATCAACCAAGAATGTCCTCCAAGAAAA
ACCCAAAGAAAGTGTAGAGTTGTTCAAGGACCGAAAGATAGAGATAGCATTCTGA
ATTAGTCCATCTTCTCCAGGATTGAAAGAAAGAGATAGAATTCTGAATTAGGTGCG

GAGATATCATTCTGGATTAGGTACAATTGTTGCCGGCACAGCCAAACCCCGCAGTGG
AGCCGGAATTGGAATTGAGTGGGTGGAGTCGAGAAGCATGGTCATCGTTCTCAAAGAG
TGTAGCCAGTAGTGTGCTCCTGGTGCAGCTGCATGCGTGCCTCTGCTGCCGCCCGGAAGGCCCG
GACGATCAGCTGGCAGCGTGCCTGCATGCGTGCCTCTGCTGCCGCCCGGAAGGCCCG
TTGATGTGCGCAGGCGAGTGGCAGCGACGGGACCGACGGCTATAAAGCACGGCAAGCACCGC
CGCCGTTCTCAATCCATCCATCCCTAGCTGATTGATTGACTAGCTAGTCATTCCCTG
CCACACTGCTAGTACTCCTCCTCGTTCCTCGTGGCAATGGTACACCAGAGCAACGGCCA
CGGCGAGGCCGCCGCCGCCAACGGCAAGAGCAACGGCACGCCGCCGCCGAA
CGGCAAGAGCAACGGCACGCCGCCGGCGGCGGTGGAGTGGAAATTGCCCGGGCAA
GGACGGCATCCTGGCAGCAGGGGGGAAGAACAGCATCCGGCGATACGGTACAAGAT
CAGCGCGAGCGTGGAGGAGAGCGGGCCCGGGCCGTGCTGCCGCTGGCCACGGTGACCC
GTCCGTGTTCCCGCCCTCCGACGGCGTCGAGGCCGAGGACGCCGTGCCGCCGCGCT
GCGCACCGGCCAGTTCAACTGCTACGCCGCCGTCGCCCTCCCGCCGACGAAGGTA
ACATTACAGCTCACCGTAATGTATGCGTGAGCATGCGCCGGTTACCTACGTGC
CCGCGCTGTTCTCCCCGGTGCCTCAAAATTAAACCTCTATAAGTACCTTATAAAA
ACAAACAGCGCCGTAGCAGAGCACTGTCACAGGGCGTGCCCTACAAGCTATCGGCCGAC
GACGTCTCCTCACCGCCGGGAACTCAGCGATCGAAGTCATAATCCGGTCTGGCC
CAGACTGCCGGGCCAACATACTGCTTCCCGGCCAGGCTATCAAATTACGAGGCCG
GCCGCATTCAACAAGCTGGAGGTCCGGCAGTCGACCTCATCCCCGACAAGGGGTGGAG
ATCGACATCGACTCGCTGGATCCATCGCCGACAAGAACACCACCGCGATGGTCATCATA
AACCCAAACAATCCGTGCCAGCGTTACTCCTACGACCATCTGGCAAGGTTTGAT
CCATGCATCCTCTGCCTCGTTGATCGACCGGTCTGTTGAACATAGTATATGGATTGCGT
TTGCTAATCGTGTGCTGATGATGCTGTTGGTATCAGGTGCGGAGGTGGCAAGGAAGC
TCGGAATATTGGTATCGCTGACGAGGTTACGGAAACTGGTCTGGCAGCGCCCGT
TTATCCCGATGGCGTCTTGGGCACATTGCCCGGTCTGTCATTGGATCTGTCCA
AGTCGTGGATAGTCGCTGGATGGCAGTGGATGGTGGCGGTGTACGACCCCAAAGA
TTTAGAGAAAATAAGTAGCTTAGCTCCCTATCATTCTCTCATATGCTACTGTGG
GATTAGTATTTGCTAAATTGACTGCTTTGTTATTCAAGATCTACGTCTATTAC
GAATTACCTTAATGTCTCACGGACCCAGCAACCTCGTTCAAGGTAGTCTTGGTTCTT
GCCCTATTTGCTCATGCCCTGTGTTGATGTCAAATGACCGGCTCAAGTTAGTATAT
AGAGTTTGTAAAGTGTGAATGTCGAAGTCCAACATGATGGAAGAAAGATACTATT
TTTAGTCATTCCCTTGTGTTGATTCCATAAAATAAAACACAAAGCCAGAAC
AACTATTGAATAGAACTATTTCCTAGAAAATAACATTGTATTTGAGCATGCCATAT
TCTTTGATCAAGTATGCAATATATTAAAACCTGCTTGTACTACGAGTATACCATGTT
GTTAAGAATTCTTACCTACAACACCTTGTCTGCATCTCATATTGATATCCTTGA
CATTATTGTTCTTATGATTACACAACCTTAATTATGGATTTGCTATCAAATTGT
TTAGGAAGCTCTCCTAAATTCTGAGAACACAAAGCAGATTCTTAAAGAGGATTAT
TGGTCTACTAAAGGAATCATCAGAGATATGTTAGGGAAATAAGGAAACAAATATAT
TACGTGTCCTCACAGCCAGAAGGATCGATGTTGTAATGGTAAGCTAAGCATAGACTTA
CTTTTAAGGTTAATCTGGATCTCAGTCATCCAACAAACATCAAATCAAATATAAT
TATGTTTGCTATGGATCTTGAAGATGCATGCTTGAAGAATAATGAAGAGAGTTG
AAATTATTAGGACTAATCTCCTGATATCATTTGTCCTTGTATTACTGTAA
ATTGGTAACACTCAAATCATATTACAAAAGTTCCCTCCATTGGTAAAGATTGACTT
CCTTCTATAACCATGTTAACCTCCATGTAACAGGTCAAACAAACTTACATCTTT
GGAGGAGATCCATGACGACATAAATTGCTGCAAGCTCGCAAAGGAAGAATCTGTAAT
TTTATGTCAGGTAGGAATGTATATGCCATTAAAGGAAACTATATGGAATAATAAT
ATCTTCTGTTACTAAACAATACTCCTCCATCCTAAATAAATGTCTTACACTTAGC
ACAATTATTAATCTAGATCTAGTACAAAGGTTATTTGGACAGAGGGAGTAG
TATATATTGTGAGAACATAAGGTTATGTTGACTGATATATGCTTAAATGTGAA
CATGTTCTTATGTTTGTATTGATACGAAGTTCTTACGTTCCGAGATGACTAC
ACATAAAATGATTACCATATCATTGTCAGAAAATGTATTACCAACATTAGAATATTCTTCT
TTTATGCAAAGACTAGCATGGCATGTACTTCTGTACCTATGTCCTTTTTC

TCGTTACATGTTGTGCTTCTCACAAAATAATAACCAAGCACATGTTCAAATGATT
ATTAATAATTTGAGGTGTTTCAACCAACTTATATACCTTCATAGTTCTAAAAAAAC
GTATATATGGTTAACCTCAACAAAACCTTATATGTTTCTCTCTAATACAGGGAGTGT
TCTTGGAAATGAAATTGGTCCGTATTACTTTGCCTGCCTTCCATCTCTTCAAGA
TGGACTCGAAAGGGTCAAATCATTCTGTCAAAGGAACAAGAAGAAGAATTCTATAATGG
TTGTTAGTTGTACACACCCCTAGTTGTACATCTGACTGAAGCTGTAATCATTTCTAGTT
ATCCCCATTTATATTTCAATAAAACATATTGTAATGGTTCTGTTGTAGCTGTCCAAGT
CATGTACTCTACTTTGATGTATTGGCCTCATTGCCTTGCATCAGTTCAATAAAAT
GGTTGTGTACACAATGATGATGTAGAGGCGAGGTGTTGACCACCTTTCAACAAAAT
CTATATCTTCAACAAATGAAACCTTGAGTCCCTTGAGTAGAAGTCAACATACTCCTT
GAATATGCTATGGTTCCATGGTCTGGATGAAACATGATGAATAGAAGTGAAGTTATATC
CATGTCAAAGTTTTAATGTTAATTTCATTATGAGAACTTGATATTACTCTAGCAC
ACATTCTCTGAAGTAATTGTCAGTTGGTACTTGAAGGGACCTATATTTCTATTGGG
GGGGGGGGGTGAATAGCGGTTATAACCAATTGTATATTGAGAATATCTTAATGTGGA
ATTAAACTAGGTGAATATTTTCCAATAAAGGGTGTGTTATTGACTCACATGTACCA
TCAAGGGATAACAATCATAATGAGTACACAATCGACATCTACATAATCAGGTGACACGG
CCAACACACACACACGACACACACATTACACACACAAATCATGCTGACGAAGAGCGAA
GTCATACAAGATCAAACATGCCTAGGCGGAGGAAGAATAGAAAACATGAAGAAATGA
AAAACCGTGAACATACTGACCATCGACGACAAACATCTGTAGACAACACAAAAA
CTGCGAGAAAAGTTCTATAAAACTGGCGCTTCCGAGAAGGAAACGACGTGCAAGAGTTGC
CATCATCGGATCCAACCAACTAAGGTCAATCCTGGTTTCATCCTGAAGATCAAATCG
AGCAAACCTCCGAGTAATGTCCTTATTAGGTAACGATTCAAATGCCACAATCATGAG
TTATGACCAATTAGACCAGACCTAGGATTTTATCCAAAGCTCGAGACGGGTACTCTAGA
AGTACCATCCAATTGAAGTCATCCCACCTGCCTCAATAACAAATAGTTGCATAGATGCACG
GTCCATATGGCGAGTAATGGACATGAGCGCGCATGTTAGGTTAACGTGACGTGACAAGA
GCCTGTGCCACCACTCGACGAAGTGTGTTGATGGGAGGAAGAAGTATGGCTCCACCAAC
ATCCAAGTTGAAACATTCTAGAGCCCTTACCATACTCACAAAGCGACAATTGATGAC
TATCTGTATCAGACGACAAATCCATGTCCGTCACTCGCTATCTGGTCATTGACATAC
TACCTGGCAAAGGCAGATTCAAGCCCCAGACAGCCTGGCGGCCGC

第 10 図

ctgcattccattgcaatggtatgattatcaaaacgaaagaaagagatggcatgtgcc
 ctgtgtcatccctcaactggcttggcgaatggcataccgagtttagtagtgcgtttt
 ttagcatgtatgtctgcggcactgccaagaaaactgcgtgcagcggactgcaggagtt
 gagcgatgcattgtatgagcggagctgagttgtcactaactgaacccaatca
 gcattgggtgagtcgagtcgagaagcatcatgcttctgcgtcccgatccgcttatctt
 ttctcccaaattattaaagaggatagatgtatgtgtgtgtggtagagtacgtgc
 atagaaccaaagcgaggcggcggaaaatatgcccgggataatggtggcaggccgcaacggc
 cacgcccgtcaagctggcagcggcgtccagagcgtgtccagagcgtgcgcgtgcgt
 tcttgctgcccggccgggttcgtgtcggtcagagcaacggctatataaggaccgtcaatc
 accgctactcaatccgtcccaactcgttcctattacCGCTACTAGTATTCCCTGGT 600

GTAGTCTAGTAGTACTCCTCCTCCTCCTACCCGTTCCATGGCCACCGT
 M A T V NAAT-B

ACGCCAGAGCGACGGAGTCGCCCGAACGGCTTGCCTGGCGAGCCGCGAACGGCAA
 R Q S D G V A A N G L A V A A A A N G K

GAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGCCGTGAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGG
 S N G H G V A A A V N G K S N G H G V D

TGCCGACGCCAACGGCAAGAGCAACGGCCATGGCGTGGCTGCCGACCGAACGGCAAGAG
 A D A N G K S N G H G V A A D A N G K S

CAACGGCCATGCCGAGGCCACTGCGAACGGCCACGGCGAGGCCACTGCGAACGGCAAGAC
 N G H A E A T A N G H G E A T A N G K T

CAACGGCCACCGCGAGAGCAACGGCCATGCTGAGGCCGACCGAACGGCGAGAGCAA
 N G H R E S N G H A E A A D A N G E S N

CGAGCATGCCGAGGACTCCGCCGAACGGCGAGAGCAACGGCATGCCGGCGGGCGGC
 E H A E D S A A N G E S N G H A A A A A A

AGAGGAGGAGGAGGCCGTGGAGTGGATTTCGCCGGTGCCAAGGACGGCGTGTGGCGGC
 E E E E A V E W N F A G A K D G V L A A

GACGGGGCGAACATGAGCATCCGGCGATACGGTACAAGATCAGCGCGAGCGTCAGGA
 T G A N M S I R A I R Y K I S A S V Q E

GAAGGGGCCGGCCCGTGTGCCGTGGCCACGGGACCCGTCCGTGTTCCCGCCCTT 1200
 K G P R P V L P L A H G D P S V F P A F

CCGCACGGCCGTGAGGCCGAGGACGCCGTGCCGCCGCGCTGCGCACCGGCCAGTTCAA
 R T A V E A E D A V A A A L R T G Q F N

CTGCTACCCCGCCGGCGTGGCCTCCCCGCCGCACGAAGgtacaacaacaacaacacaa
 C Y P A G V G L P A A R S

gaacaatttcctttcgcgtgtcgatcgccggcaatccatgcgtgcgtgtgcgcgt
 ttcacgtgtccgtccgtccgtccaccgttccttcctccatgcggcatgagaaatct

gaccttctcccaccttataccaaacaaaacaaaaacacagCGCCGTGGCAGAGCACCT
A V A E H L
GTCGCAGGGCGTCCGTACATGCTATCGGCCGACGACGTCTCCTCACCGCCGGCGGGAC
S Q G V P Y M L S A D D D V F L T A G G T
CCAGGCGATCGAGGTCTAAATCCCAGGTGCTGGCCCAGACCGCCGGCGCCAACATTCTGCT
Q A I E V I I P V L A Q T A G A N I L L
CCCCAGGCCAGGCTACCCAAACTACGAGGCCGCGCCGCGTTCAACAGGCTGGAGGTCCG
P R P G Y P N Y E A R A A F N R L E V R
GCATTCGACCTCATCCCCACAAGGGGTGGGAGATCGACATCGACTCGCTGGAATCCAT
H F D L I P D K G W E I D I D S L E S I
CGCCGACAAGAACACCACCGCCATGGTCATCATAAACCCAAACAACCGTGCAGCGT 1800
A D K N T T A M V I I N P N N P C G S V
TTACTCCTACGACCATCTGTCCAAGGtttcacatccttgcccttgctgaatatggattca
Y S Y D H L S K
gttcagtgcacctgctgaattcttttgcacatcgcatactgactgatgttgctcaatta
gGTCGGAGGTGGCGAAAGGCTCGGAATATTGGTATTGCTGACGAGGTACGGCAA
V A E V A K R L G I L V I A D E V Y G K
GCTGGTTCTGGGCAGCGCCCCGTTCATCCCAATGGGAGTGTGTTGGCACATCACCCCTGT
L V L G S A P F I P M G V F G H I T P V
GCTGTCCATAGGGCTCTGTCCAAGTCATGGATACTGCCTGGATGGCGGCTGGATGGT
L S I G S L S K S W I V P G W R L G W V
AGCGGTGTACGACCCCCAGAAAGATCTTACAGGAAACTAAGGtacttaatctctatata
A V Y D P R K I L Q E T K
ttctttcaaatgctactaaggtagttattactactgtacaatataatttgctaaat
ttgtactgacattttgtggtagATCTCTACATCAATTACGAATTACCTCAATGTCTCGA
I S T S I T N Y L N V S
CAGACCCAGCAACCTTCATTCAGgtcagtcttggtagttacctcggttcaagaaataaa
T D P A T F I Q
gtctttggtagttactcctcctgtcctatttgctccgtccctatgtttaggcagcc 2400
cacgtgcacgtcaagtgcacgtttttcacattaagttggaaagtcaaaagtcagacacat
acactttagttatattaccttggtagttgtttgatccgataaaataaaaaataaaaa
ctgaacctactgtgaatataaccactgttcttacaagatatacatgattgcactatgg
catgccatattctttgggtcaagtatgcagttgttttagaaaaatagat
acattgtactatgagtataccatattattaagaatttcatatttgatattcctgtatgg
attgttcttgcattcacacgattactgtgtttttgtactatcaaattgttcag
GCAGCTCTTCAGATTCTGAGAACACAAAGGAAGATTCTTAAGGCGATTATTGGT
A A L P Q I L E N T K E D F F K A I I G

CCACACTGCTAGTACTCCTCCTCGTTCCTCGTGGCAATGGTACACCAGAGCAACGGCA
M V H Q S N G H NAAT-A

CGGCGAGGCCGCGCCGCGCCGCAACGGCAAGAGCAACGGGCACGCCGCCGCCGCGAA 6600
G E A A A A A N G K S N G H A A A A N

CGGCAAGAGCAACGGGCACCGCGGCGGCGGCGGTGGAGTGGAAATTCCGCCGGGGCAA
G K S N G H A A A A A V E W N F A R G K

GGACGGCATCCTGGCGACGGGGCGAAGAACAGCATCCGGCGATACGGTACAAGAT
D C I I A T T G A K N S I R A I R Y K I

CAGCGCGAGCGTGGAGGAGAGCGGGCCGCGGCCGTGCTGCCGCTGGCCCCACGGTGACCC
S A S V E E S G P R P V I P L A H G D P

GTCCGTGTTCCCGGCCCTCCGCACGGCCGTCGAGGCCGAGGACGCCGTCGCCGCCGCT
S U D D S E P T A V E A E D A V A A A L

GCGCACCGGCCAGTTCACTGCTACGCCGCCGGNNNTGGCCTCCCCGCCGCACGAAGgtat

acatttacagcttcaccgtaatgtatgcgtgagcatgcgtgcgcgggttacttacgtgc
 ccggcgctgttcttccccggtgcggtcaaaatttaaccttctataagtaccttataaaaa
 acaaaacagCGCCGTAGCAGAGCACTTGTACAGGGCGTGCCCTACAAGCTATCGGGCGAC
 A V A E H L S O G V P Y K L S A D

GACGTCTCCTCACCGCCGGCGGAACCTCAGGCGATCGAAGTCATAATCCCGGTGCTGGCC
D V F L T A G G T Q A I E V I I P V L A

CAGACTGCCGGCGCCAACATACTGCTTCCCCGGCCAGGCTATCAAATTACGAGGCCGA 7200
Q T A G A N I L L P R P G Y P N Y E A R

GCGGCATTCAACAAGCTGGAGGTCCGGCACTTCGACCTCATCCCCGACAAGGGTGGGAG
A A F N K L E V R H F D L I P D K G W E

ATCGACATCGACTCGCTGGAATCCATCGCCGACAAGAACACCACCGCGATGGTCATCATA
I D I D S L E S I A D K N T T A M V I I

AACCCAAACAATCCGTGCGGCAGCGTTACTCCTACGACCATCTGGCCAAGGttttgcatt
N P N N P C G S V Y S Y D H L A K

ccatgcatttcgtgtgttatcagGTCGGAGGTGGCAAGGAAGC
V A E V A R K

TCGGAATATTGGTATCGCTGACGAGGTTACGGCAAACGGTTCTGGCAGCGCCCCGT
L G I L V I A D E V Y G K L V L G S A P

TTATCCGATGGCGTCTTGGCACATTGCCCGGTCTGTCCATTGGATCTCTGTCCA
F I P M G V F G H I A P V L S I G S L S

AGTCGTGGATAGTGCCTGGATGGCGACTTGGATGGTGGCGGTACGACCCCCACAAAGA
K S W I V P G W R L G W V A V Y D P T K

TTTAGAGAAAACAAAGgttagcttagctccatatcattttcatatgctactgtggg
I L E K T K

gattagtattttgcataattgtactgccttgcatttcattcagATCTACGTCTATTAC 7800
I S T S I T

GAATTACCTTAATGTCTCACGGACCCAGCAACCTCGTCAGgttagtctttgggtctt
N Y L N V S T D P A T F V Q
gccctattttgtcatgtccctgtgtgcattgtcaaatgaccggcttcaagtttagtata
agagtttttgttaagtgtgaatgtcgaaagtccaaacatgtatggaaagaaagatacatctatt
tttagtcattccctttgtttgattccataaaataaaacacaaagccagaacc
aactattgaatagaactattttcttagaaaatatacattgtatttgagcatgccccat
tctttcgatcaagtatgcaatataaaaaacttgcattgtactacgagatataccatgtt
gttaagaatttcttacccataacacccgtctcgcatcttcatatggatattgtatccctga
cattattgttctttagattcacacaacttaattatggatattgtatccctga
tttagGAAGCTCTCCTAAATTCTGAGAACACAAAGCAGATTCTTAAGAGGATTAT
E A L P K I L E N T K A D F F K R I I

TGGTCTACTAAAGGAATCATCAGAGATATGTTAGGGAAATAAGGAAAACAAATATAT 8400
G L L K E S S E I C Y R E I K E N K Y I

TACGTGTCTCACAGCCAGAAGGATCGATGTTGTAATGgttaagctaagcatagactta
T C P H K P E G S M F V M

cttttaaggtaatctggatctcagtgcattccaaacaaatcaatcaaaatataat
tatgtttgctatggatctttgaagatgcattgaagaataatgaagagagttg
aaattattttaggactaatcttgcattgtccattttgttattactgtaa
atggtaacactcaaattacattacaaaaagttccctccattttagtaagattgactt
ccttctataaccatgtatataacttccatgtaaacagGTCAAACTAAACTACATCTTT
V K L N L H L L

GGAGGGAGATCCATGACGACATAAATTTTGCTGCAAGCTCGCAAAGGAAGAATCTGTAA
E E I H D D I N F C C K L A K E E S V I

TTTATGTCCAGgttaggaatgtatatggccattttaaaggaaaactatatggaaaaataat
L C P

atctttcttggtaactaaacaataacttcctccatcctaaaataatgtcttacacttagc
acaattttatactagatctagtaaaaaggtaaaacagttatttggacagagggagtag 9000
tatatatgtgtgagaacataagggtatgttactgatataatgcttcttaatgtgaaa
catgttctttatgttttggattgtatacgaaggttatcagttccgagatgactac
acataaaatgattaccatatcattgtcagaaaatgtattaccacattagaatattcttct
tttatgcaaagactagcatggcatgtactttccttgcacccatgtgtcttttttc
tcgttacatgttgccttcacaaaaataataatccaaaggcacatgttccaaatgatt
attaataatttgggggttttcaaccaacttatataactttcatagttcttaaaaaacc
gtatatatggtaactctaacaaaaaacttatataatgtttctcttaatacagGGAGTGT
G S V

TCTTGGAAATGGAAAATTGGGTCCGTATTACTTTGCCTGCGTCCATCTTCTCTTCAAGA
L G M E N W V R I T F A C V P S S L Q D

TGGACTCGAAAGGGTCAATCATTCTGTCAAAGGAACAAGAAGAATTCTATAAATGGG
G I E R V K S F C Q R N K K K N S I N G

TTGTTAGTTGTACACACCCCTAGTTGTACATCTGACTGAAGCTGTAAATCATTCTAGTT 9600
C *
ATCCCCATTTATATAATTCATAAAACATATTGTAATGGTTCTGTTGTAGCTGTCCAAGT

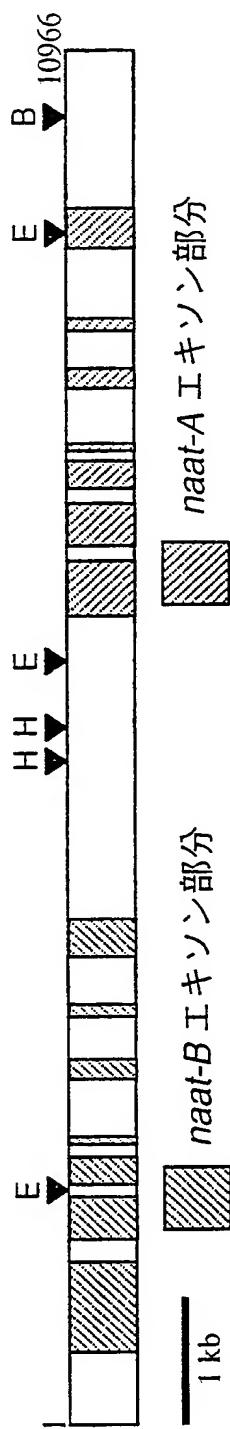
GATCTACTCTACTTTTGATGTATTGGCCTCATGGCCTGCATCAGTTCAATAAAAT

attaaacttaggtaatatttttccaaataaaggggatggatccatataatcgg
tcaagggataacaatcataatgagttacacaatcgacatctacataatcaggttgcatatgg

အရှင်အမှတ်အားလုံးကို အမြန် အမြန် ပေါ်လောက်နိုင် မှုပါ။

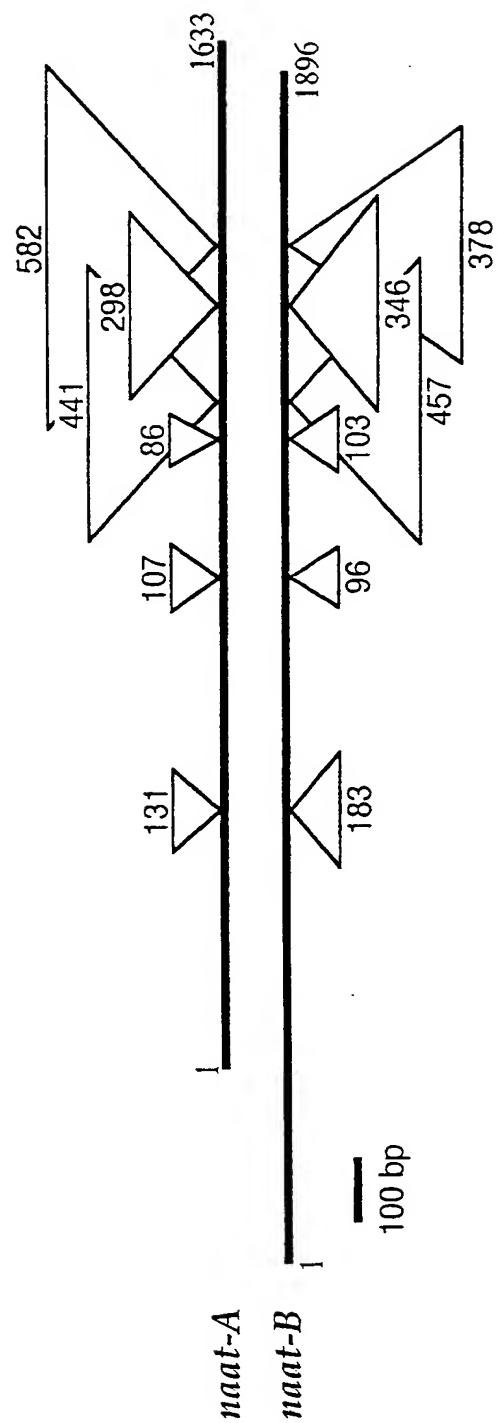
ttatgaccaattagaccagacacctaggattttatccaaagctcgagacgggtactctaga
agtaccatccaattgaagtcatcccactgcctcaataaaaaatagttgcataatgcacg
gtccatatggcgagtaatggacatgagcgcgcatgtgttagttaacgtgacgtgacaaga
gcctgtcgccaccactcgacgaagtgtttgatggggaggaagaagtatggctccaccaac 10800
atcccaagtttgaaacattctagagcccttaccataactcacaaagcgacaattgtgac
tatctgtatcagacgacaaatccatgtccgtcactcgcttatcttggtcattgacatac
tacctggcaaaggcgattcaagccccagacagcctggcgccgc

第 11 図



ゲノム断片の模式図。E: *EcoRI*, H: *HindIII*, B: *BamHI*.

第 1 2 図



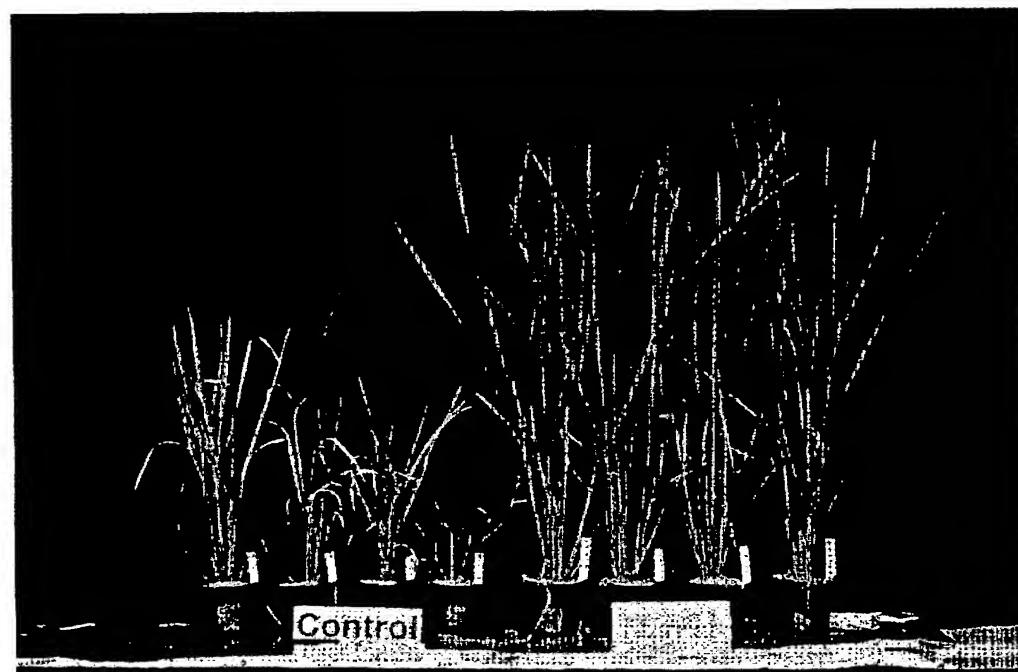
第 13 図

MVHQSNHGGEAAAAANGKSNHGAAAANGKSNHGAAAAAVEWNFARGKDGILATTGAKNS
IRAIRYKISASVEESGPRPVPLAHGDPSVFPFRATAVEAEDAVAAALRTGQFNCYAAVG
GLPAARSAVAEHLSQGVYPYKLSADDVFLTAGGTQAIIEVIIIPVLAQTAGANILLPRPGYPN
YEARAAFNKEVRHFDLIPDKGWEIDIDSLESIADKNTTAMVIINPNNPCGSVSYDHHLA
KVAEVARKLGILVIADEVYGKLVLSAPFIPMGVFGHIAPVLSIGSLSKSWIVPGWRLGW
VAVYDPTKILEKTKISTSITNYLNVSTDPATFVQEALPKILENTKADFFKRIIGLLKESS
EICYREIKENKYITCPHKPEGSMFVMVKLNLHLEEIHDDINFCKLAKEESVILCPGSV
LGMENTWVIRITFACVPSSLQDGLERVKSFQQRNKKNSINGC*

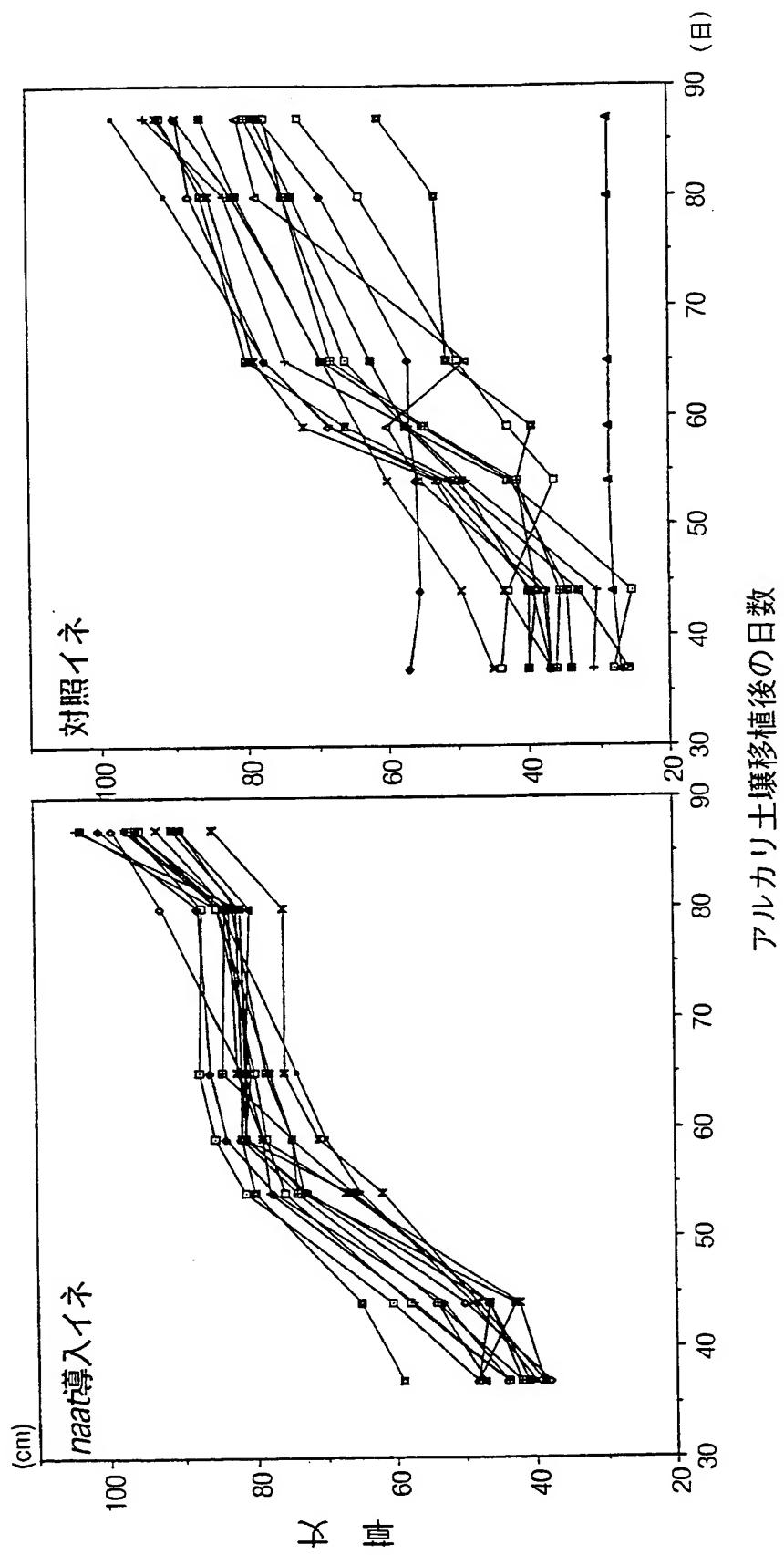
第 14 図

ATVRQSDGVAANGLAVAAAANGKSNHGVAAVANGKSNHGVDADANGKSNHGVAADAN
GKSNHGAEATANGHGEATANGKTNGHRESNGHAEAADANGESNEHAEDSAANGESNGHAA
AAAEEEEAVEWNFAGAKDGVLAATGANMSIRAIRYKISASVQEKGPRPVPLAHGDPSVF
PAFRATAVEAEDAVAAALRTGQFNCYPAGVGLPAARSAVAEHLSQGVYPYMLSADDVFLTAG
GTQAIIEVIIIPVLAQTAGANILLPRPGYPNEYEARAAFNRLEVRHFDLIPDKGWEIDIDSLE
SIADKNTTAMVIINPNNPCGSVSYDHLSKVAEVAKRLGILVIADEVYGKLVLSAPFIP
MGVFGHITPVLSIGSLSKSWIVPGWRLGWAVYDPRKILQETKISTSITNYLNVSTDPAT
FIQAALPKILENTKEDFFKAIIGLLKESSEICYKQIKENKYITCPHKPEGSMFVMVKLNL
HLEEIIDDDIDFCCKLAKEESVILCPGSVLGMANWVIRITFACVPSSLQDGLGRIKSFCQR
NKKRNSSDDC*

第 15 図



第 16 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<110> Mori, Satoshi

<120> Creation of the transgenic graminaceous plants tolerant to
Fe-deficiency in calcareous soils

<130> JA903969

<150> JP 11-190318

<151> 1999-07-05

<160> 1

<210> 1

<211> 10966

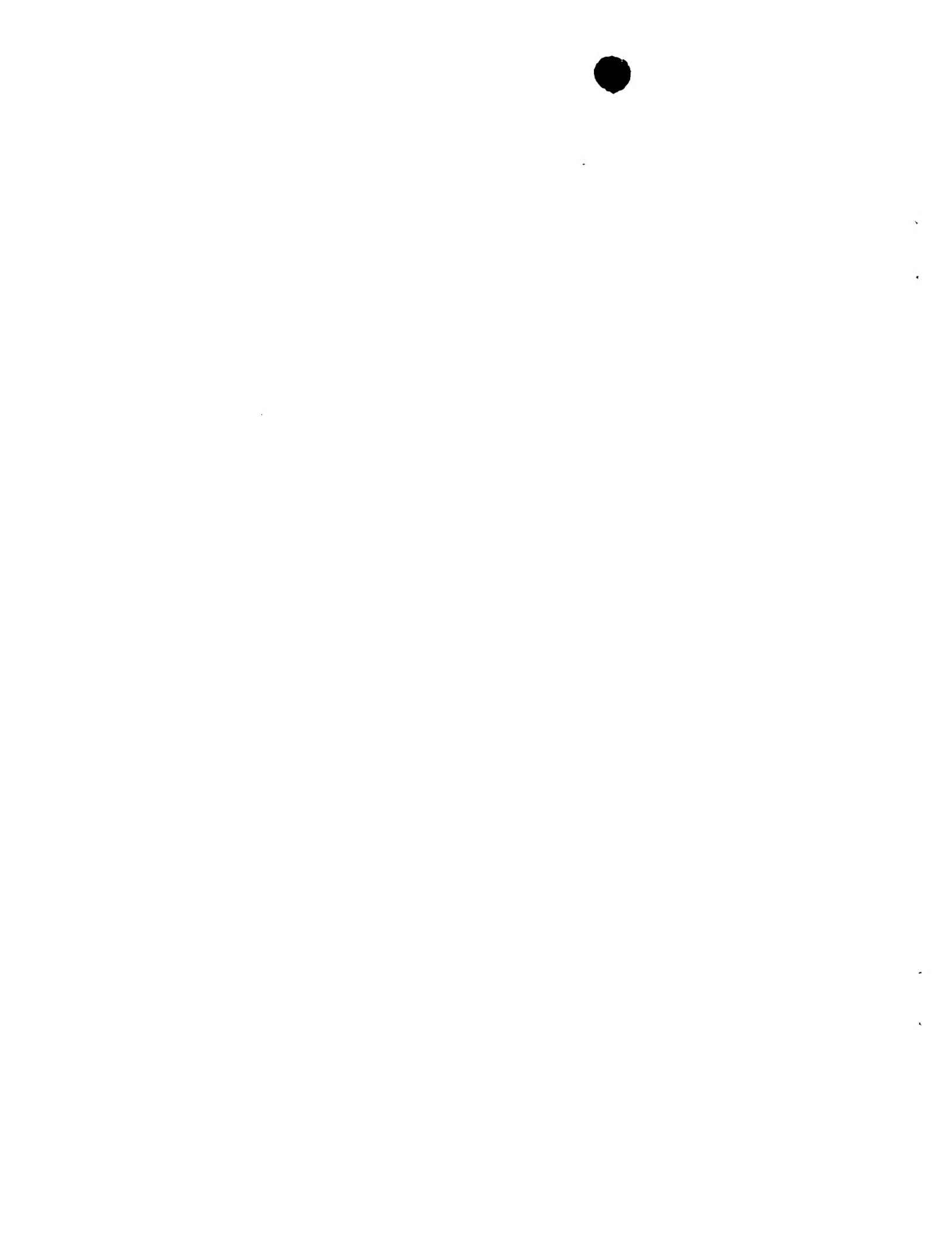
<212> DNA

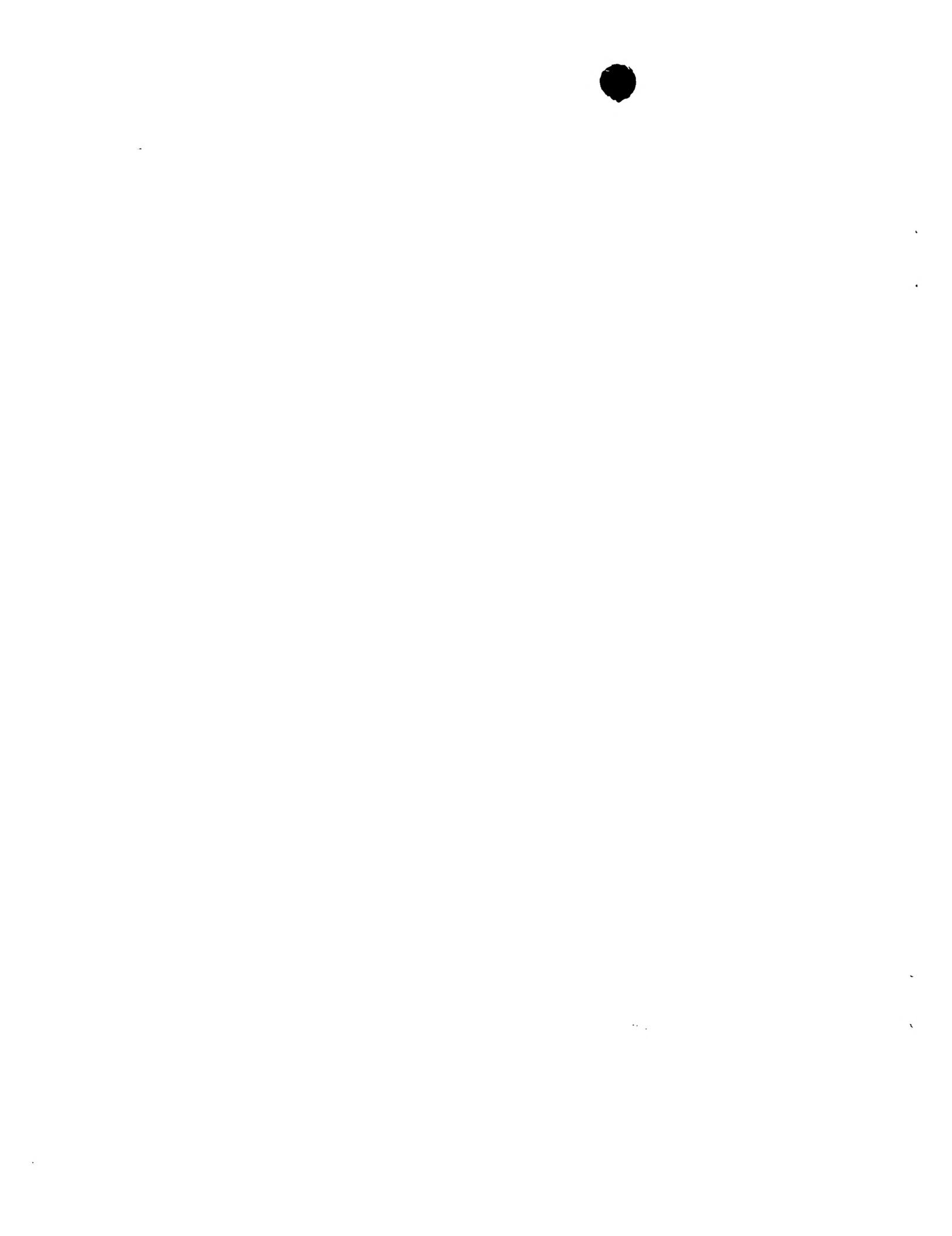
<213> Hordeum vulgare L. var. Igri

<400> 1

ctcgatcca ttgcaatgg t atgattagct atcaaacgaa agaaagagat ggcaatgtgcc	60
ctgtgtgtca tcccttactg gcttggcgaa tggcgatacc gagtttaggtt gagttttttt	120
tttagcatgtat gtcgtccggc actgccaaga aaactgcgtg cagcggactg caggagagtt	180
gagcgatgca tgctttgtttt tgagcggagc tgagttgggtt tcactaactg aacccaatca	240
gcattgggtt agtcgagtcg agaagcatca tgcttccgtgc gtcccgatcc gcttatcttt	300
ttctcccaa ttatcaaaga gggatagatg atggttgtgtt gggttgggtt gagtacgtgc	360

atagaaccaa agcgaggcgc cgaaaatatg ccggggataa tggggcagg ccgcaacggc 420
cacgcccgtc agcggcagc ggctggccag agcgtgccag agcgtgcgcg cgtgcgtgc 480
tcttgcgtcc ggccccgggt cgtgtgcggt cagagcaacg gctatatagg accgtcaatc 540
accgctactc aatccgtccc caactcggtt cctattaccg ctactatgtatccgtt 600
gtatgtatgt agtactccctc ctcctccctc tccctccctacc cgtttccctca tggccaccgt 660
acgccagagc gacggagtcg ccgcgaacgg ccttgcgtg gccgcagccg cgaacggcaa 720
gagcaacggc catggcggtgg ctggcgccgt gaacggcaag agcaacggcc atggcggtgg 780
tgccgacgacg aacggcaaga gcaacggcca tggcggtggc gccgacgcga acggcaagag 840
caacggccat gccgaggccca ctgcgaacgg ccacggcgag gccactgcga acggcaagac 900
caacggccac cgcgagagca acggccatgc tgaggccgac gacgcgaacg gcgagagcaa 960
cgagcatgcc gaggactccg cggcgaacgg cgagagcaac gggcatgcgg cggcggcg 1020
agaggaggag gaggcggtgg agtggaaattt cgcgggtgtcc aaggacggcg tgctggcg 1080
gacggggcg aacatgagca tccggcgat acggtaacaag atcagcgcga gctgtgcagga 1140
gaaggggccc cggcccggtgc tgccgcgtgg ccacggggac ccgtccgtgt tcccgccct 1200
ccgcacggcc gtcgaggccg aggacgcccgt cgccgcccgt ctcgcacccg gccagttcaa 1260
ctgctacccc gccggcgicg gcctccccgc cgcacgaagg taacaacaac aacaacacaa 1320
gaacaatttc cttttcgtgt gtcgtgtcgc gctggcaatcc atgcgtgcgc atgtggcg 1380
ttcacgtgtc cgtccgtccg tccaccgttc ctccctccctc cctacgcccc tggaaaatct 1440
gaccttctcc cacctatac caaacaacaa aaaaaaacac agcggcggtgg cagagcac 1500
gtcgcagggc gtggcgatca tgctatcggtc cgacgacgtc ttccctcaccg cggcgggac 1560
ccaggcgatc gaggtcataa tcccggtgtt ggcccgacc gccggcgcca acattctgt 1620
ccccaggcca ggctacccaa actacgaggc ggcgcggcgt tcaacaggc tggaggcg 1680
gcatttcgac ctcatccccg acaaggggtt ggagatcgac atcgactcgc tggaaatccat 1740
cgccgacaag aacaccaccc ccatggicat cttaaacccca aacaacccgt gcggcagcgt 1800
ttacccctac gaccatctgtt ccaagggttc acatcccttttgcgttccat tggatgttca 1860
gttcaatgtca cctgcgtgaat tcttttgcgttccat tggatgttcaatgttcaatgttca 1920
ggtgcggag gtggcgaaaa ggctcgaaat atgggtgtt gctgacgagg tatacggcaa 1980
gctgggttcgtt ggcagcgccc cgttcgttcc aatgggagtg ttggggcaca tcaaccctgt 2040
gctgtccata gggtcgttcaatgttcaatgttcaatgttcaatgttcaatgttcaatgttca 2100





catgttctct tatgtttttt gattgtatac gaagttctta tcagttccg agatgactac 9120
 acataaaatga ttaccatatac attgtcagaa aatgtattac cacattagaa tatttttcti 9180
 ttttatgcaa agacttagcat ggcatgtact ttcccttgc cctatgtgtc ttttttttc 9240
 tcgttacatg ttgtgcitc tcacaaaaat aataataccca agcacatgtt ccaaatgatt 9300
 attaataattt ttaggggttt ttcaaccaa ctatataact ttcatagttc taaaaaaacc 9360
 gtatataatgg ttaactctaa caaaaactta tataatgttt ctccttaata cagggaggtt 9420
 tcttggaaatg gaaaattggg tccgtattac ttgtgcitc gttccatctt ctccttaaga 9480
 tggactcgaa agggtcaaattt cattctgtca aaggaacaag aagaagaattt ctataatgg 9540
 ttgttagttt tacacaccccc tagttgtaca tctgactgaa gctgtttaatc atttttagtt 9600
 atccccatttt atatatttca ataaaacata ttgtatgtt tctgtttagt ctttccaaat 9660
 catgtactctt actttttgtt gtatttggcc tcattgcctt gcatcagttt caataaaaaat 9720
 gtttgggttac acaatgtatgtt tttttttttttt accaccctttt caacaaaaat 9780
 ctatatactttt caacaaatga aaccttgatg tccctttttagt tagaagtcaaa catactccctt 9840
 gaatatgtca tggtttccat ggtctggatg aaacatgtatgtt aatagaatgtt aagttatatac 9900
 catgtcaaaatg ttttttttttca ttatgagaac ttgtatataatc ctcttgcac 9960
 acattctctt aagtaattttt cagttggta ctgttggaa cctatataatc ttctttaggg 10020
 ggggggggggtt gaataggcggtt ttataacca attgtatattt tggaaatatac ttaatgtgg 10080
 aitaaactatgtt tttccatataa agggttgtttt tattgtactca caatgttacca 10140
 tcaaggata caatcataat gagtacaccaa tcgacatctt cttatcagg ttgcatacgg 10200
 ccaacacaca cacacgcaca cacacatctt cacacacaaa tcaatgttacca gaagagcgaa 10260
 gtcatatacaatg atcaaaaactt tgccttggcg gaggaagaat agaaaaacat gaagaaatgtt 10320
 aaaaccgttca ctgacaacat actgaccatc gacgacaaac atctgttacca aacacaaaaat 10380
 ctgcgagaaa agtttttataa aactggcgcc ttgttggaaagg aaacgttgcg caagatgttgc 10440
 catcaatcggtt tccaaaccactt aagggttcatat cctgggtttt catcttgcac atcaatccgtt 10500
 agcaaaacttcc gagttatgtt tttttttttttttaacgttca aaaaatgttca caatcatgtt 10560
 ttatgttcaaa ttagaccaga ccttaggtttt ttatccaaatgtt ctttttttttttgcacgg gtacttgcac 10620
 agtaccatcc aattgttgcac atccacttgc cttcaatataa aatgttgcac tagatgttgcac 10680
 gtccatataatggt ttttttttttttgcacggt ttttttttttttgcacggt gtacttgcac 10740
 gtttttttttttgcacggt ttttttttttttgcacggt ttttttttttttgcacggt gtacttgcac 10800

atcccaagg t gaaacattc tagagcccc t accataactc acaaagcgac aattgatgac 10860
tatctgtatc agacgacaaa tccatgtccg tcactcgctc tatcttggtc attgacatac 10920
tacctggcaa aggcggttcc aagccccaga cagccctgggc ggccgc.... 10980

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol.43 [SPECIAL EDITION] (1997), pp.975-980	1-11
P, X	Plant Physiol., vol.121 [3] (1999), pp.947-956	1-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

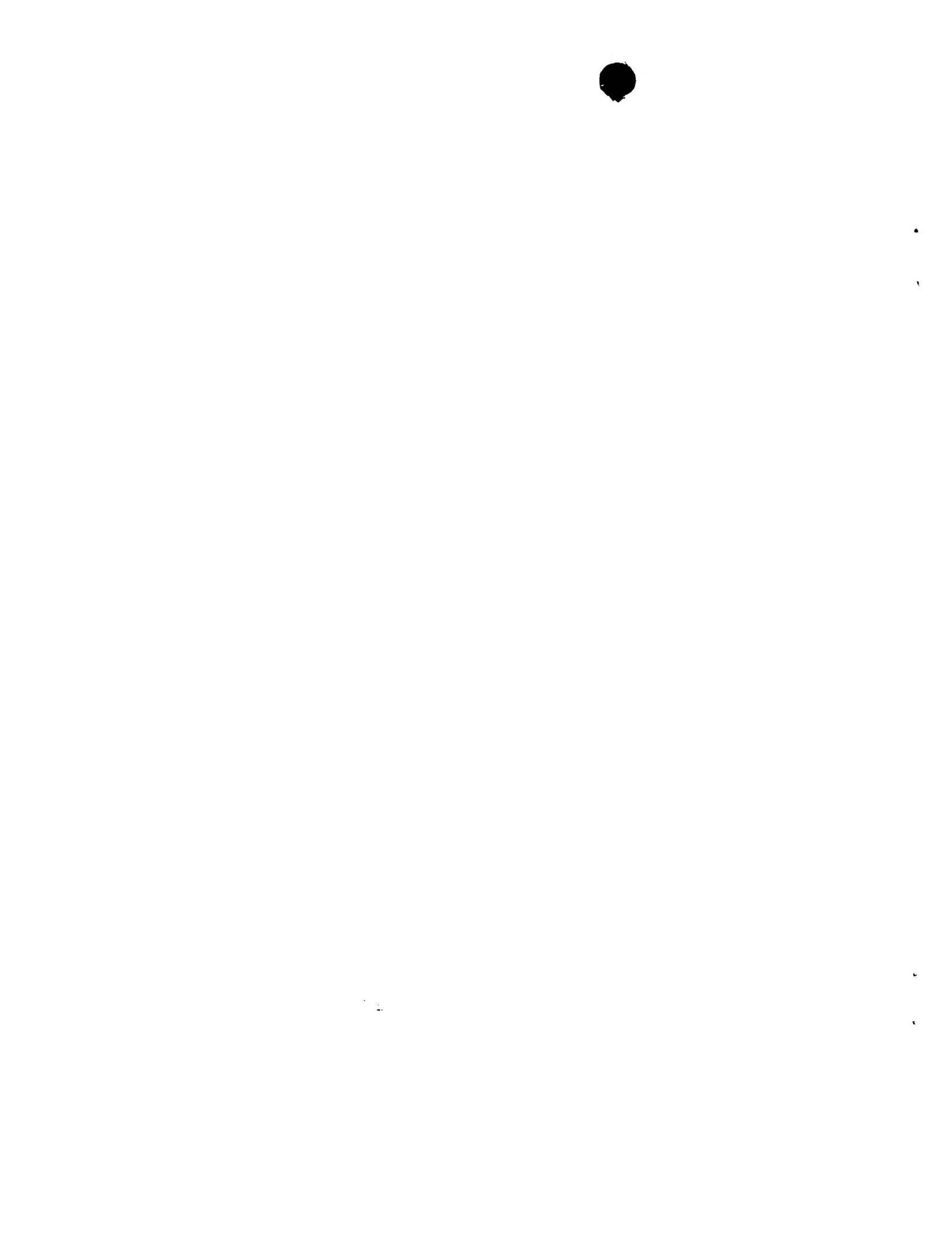
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 October, 2000 (16.10.00)Date of mailing of the international search report
24 October, 2000 (24.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol. 43[SPECIAL EDITION] (1997), p. 975 -980	1-11
P, X	Plant Physiol., vol. 121[3] (1999), P. 947-956	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

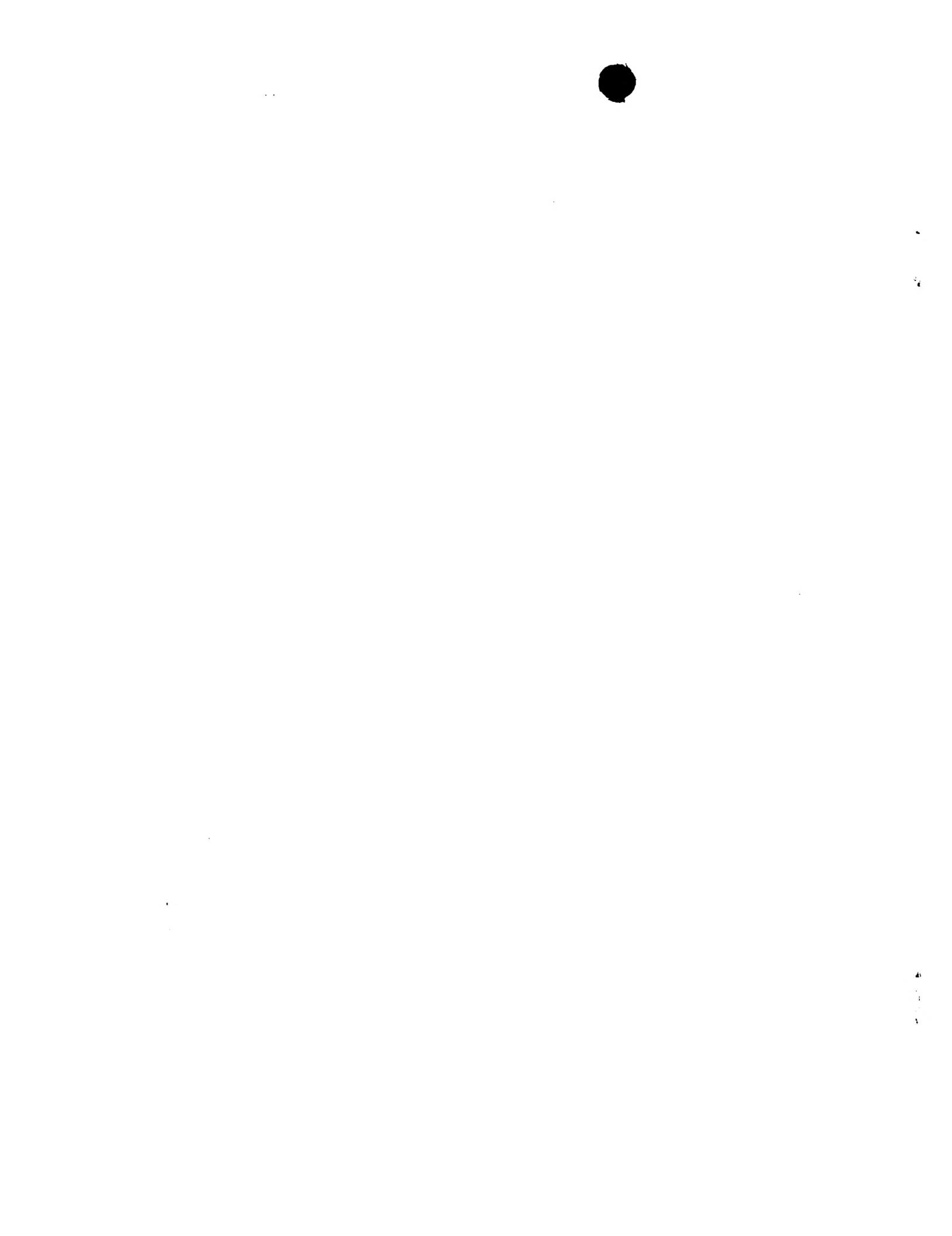
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂 田 誠

2B 9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 11 January 2001 (11.01.01)	
International application No.: PCT/JP00/04425	Applicant's or agent's file reference: JA903969
International filing date: 04 July 2000 (04.07.00)	Priority date: 05 July 1999 (05.07.99)
Applicant: MORI, Satoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

01 December 2000 (01.12.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

67

特許協力条

PCT

REC'D AUG 2001

WIPO

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号	JA903969		今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04425	国際出願日 (日.月.年)	04.07.00	優先日 (日.月.年)	05.07.99
国際特許分類 (IPC) Int. C1' A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52				
出願人（氏名又は名称） 科学技術振興事業団				

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対しても訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 1 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I 国際予備審査報告の基礎

II 優先権

III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV 発明の單一性の欠如

V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ある種の引用文献

VII 国際出願の不備

VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.12.00	国際予備審査報告を作成した日 06.08.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 坂田 誠 電話番号 03-3581-1101 内線 3237
	2B 9318



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

出願時の国際出願書類

明細書 第 1-24 ページ、
明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 2, 3, 6, 8-11 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 1, 5, 7 項、
出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
14.05.01 付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 1-24 ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
図面 第 _____ ページ/図、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 4 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-3, 5-11 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 _____ 有
請求の範囲 1-3, 5-11 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-3, 5-11 有
請求の範囲 _____ 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-11

国際調査報告で引用した文献1 {Soil. Sci. Plant Nutr., vol. 43[SPECIAL EDITI ON] (1997), p. 975-980} には、オオムギにおいて鉄欠乏により誘導されるムギネ酸類生合成経路中の酵素であるニコチアナミノ基転移酵素 (N A A T) をコードする遺伝子n a a t のc DNAをクローニングした旨記載されており、これに基づいて対応するゲノム遺伝子を単離することに格別の困難は認められない。そして、上記文献1 (特にIntroduction参照) にはムギネ酸類整合性経路の遺伝子を植物に導入することで、鉄欠乏耐性植物を作出することが示唆されているので、上記の遺伝子を適宜のプロモータとともにイネ科植物に導入し、鉄欠乏耐性植物を作出することは、当業者が容易に想到し得ることと認められる。

請求の範囲

1. (補正後) イネ科植物にムギネ酸類生合成経路中の酵素をコードするゲノム遺伝子を導入して、鉄吸収性が改善されたイネ科植物を作出する方法。
2. 酵素がニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) であり、それをコードする遺伝子が *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
3. プロモーターが C a M V 3 5 S である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の方法。
4. (削除)
- (補正後) 5. ゲノムがオオムギのゲノム *n a a t* である請求の範囲第 1 項に記載の方法。
6. 遺伝子の塩基配列が、配列表の配列番号 1 で示される塩基配列、若しくは当該塩基配列にストリージェントな条件でハイブリダイズ可能でかつニコチアナミンアミノ基転移酵素 (N A A T) 活性を有する蛋白質を発現し得る塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列である請求の範囲第 5 項に記載の方法。
- (補正後) 7. 請求の範囲第 1 項～第 3 項または第 5 項～第 6 項のいずれかに記載の方法で製造され得る鉄欠乏耐性を有するイネ科植物。
8. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の種子。
9. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物の細胞。
10. 請求の範囲第 7 項に記載のイネ科植物を鉄欠乏耕地で育成する方法。
11. 請求の範囲第 10 項に記載の方法により得られたイネ科植物の作物。

E P

U S

P C T

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[P C T 18条、P C T規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 JA903969	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 4 4 2 5	国際出願日 (日.月.年) 04.07.00	優先日 (日.月.年) 05.07.1999
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 4 図とする。 出願人が示したとおりである. なし
 出願人は図を示さなかった。
 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A01H5/00, C12N5/14, C12N15/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Soil. Sci. Plant Nutr., vol. 43[SPECIAL EDITION] (1997), p. 975-980	1-11
P, X	Plant Physiol., vol. 121[3] (1999), P. 947-956	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂 田 誠

2B 9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

